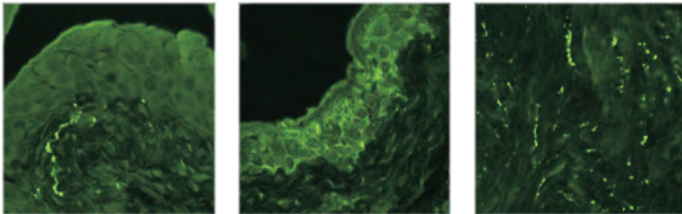


DAS CHOLINERGE SYSTEM IN DER HARNBLASE UND DER NEUROBLASTOM-ZELLINIE NS20Y DER MAUS: ACETYLCHOLIN-FREISETZUNG UND NIKOTINISCHE ACETYLCHOLINREZEPTOREN

JULIA WUNSCH

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Das cholinerge System in der Harnblase und der Neuroblastom-Zelllinie NS20Y der Maus: Acetylcholin-Freisetzung und nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Julia Irene Wunsch
aus Starnberg

Gießen 2008

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. E. Baumgart-Vogt
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Frau PD Dr. Lips
Gutachter: Herr PD Dr. Blaes

Tag der Disputation: 24.04.09

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 25.08.2008

Julia Irene Wunsch

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das cholinerge System in Neuronen	5
1.1.1	Synthese von Acetylcholin	5
1.1.2	Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin	7
1.1.3	Acetylcholin-Rezeptoren	10
1.1.4	Abbau von Acetylcholin	17
1.1.5	Die Neuroblastomzelllinie NS20Y	17
1.2	Das cholinerge System in non-neuronalen Zellen	17
1.2.1	Synthese von Acetylcholin	18
1.2.2	Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin	18
1.2.3	Acetylcholin-Rezeptoren	26
1.2.4	Abbau von Acetylcholin	28
1.2.5	Die Harnblase	28
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	31
2	Material und Methoden	33
2.1	Zellkultur	33
2.1.1	Die Zelllinie NS20Y	33
2.1.2	Wachstumsbedingungen und Lagerung	33
2.1.3	Verwendung	34
2.2	Gewebebegewinnung	34
2.2.1	Tiere und entnommene Gewebe	34
2.2.2	Gewinnung von unfixiertem Gewebe	35
2.2.3	Immersionsfixierung	35

2.2.4	Besondere Präparationsverfahren an der Harnblase	35
2.3	Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) . . .	36
2.3.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	36
2.3.2	Durchführung der RT-PCR	38
2.3.3	Auswertung der RT-PCR-Produkte	39
2.3.4	Aufreinigung des RT-PCR-Produktes zur Sequenzierung . . .	39
2.4	Immunhistochemische Verfahren	41
2.4.1	Indirekte Immunfluoreszenz	41
2.4.2	Kontrolle der indirekten Immunfluoreszenz	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Expression der molekularen Komponenten des cholinergen Systems im Urothel und in NS20Y-Zellen	47
3.1.1	Freisetzungsmechanismen von Acetylcholin	47
3.1.2	Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren	50
3.2	Lokalisation der molekularen Komponenten des cholinergen Systems im Urothel und in NS20Y-Zellen	53
3.2.1	Freisetzungsmechanismen von Acetylcholin	53
3.2.2	Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren	59
4	Diskussion	67
4.1	Das cholinerge System in der neuronalen Zelllinie NS20Y	67
4.1.1	Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin	67
4.1.2	Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren	69
4.2	Das cholinerge System im Urothel der Maus	75
4.2.1	Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin	75
4.2.2	Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren	84
5	Zusammenfassung	97
6	Summary	99

7	Literaturverzeichnis	101
8	Publikationsverzeichnis	131
8.1	Originalarbeiten	131
8.2	Auszeichnung	131
8.3	Kongressbeiträge	131
9	Danksagung	133

1 Einleitung

1.1 Das cholinerge System in Neuronen

Acetylcholin (ACh) ist ein Neurotransmitter, der erstmals 1926 als Vagus-Substanz beschrieben wurde (Loewi & Navratil 1926). Cholinerge Neuronen finden sich im Hirnstamm, Septum und in weiten Teilen des autonomen Nervensystems. Dazu gehören alle präganglionären Neurone des Sympathikus und Parasympathikus sowie die postganglionären Neurone des Parasympathikus und die die Schweißdrüsen innervierenden sympathischen Neurone (Neuhuber 2004). In der cholinergen Synapse wird ACh an der präsynaptischen Membran freigesetzt, diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an Rezeptoren der postsynaptischen Membran. An der Synapse zwischen erstem und zweitem Neuron sind dies nikotinische Rezeptoren, die einen Kationeneinstrom in die Nervenzellen vermitteln, was zur Depolarisation der Ganglionzelle und damit zu einem Aktionspotenzial führt. In der parasympathischen Synapse zwischen zweitem Neuron und Erfolgsorgan bindet ACh an muskarinische Rezeptoren, was eine Kaskade von Second-messenger-Systemen in Gang setzt (Zenker 1994). Die Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte wird ebenfalls durch ACh vermittelt. Hier bindet ACh an nikotinische Rezeptoren, was zur Depolarisation der Muskelzelle mit nachfolgender Kontraktion führt (Drenckhahn 2003b).

1.1.1 Synthese von Acetylcholin

Im Zytoplasma cholinergischer Neurone (Abb. 1.1) wird ACh durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Das Acetyl-CoA wird aus verschiedenen Stoffwechselvorgängen wie Citratzyklus oder Fettstoffwechsel

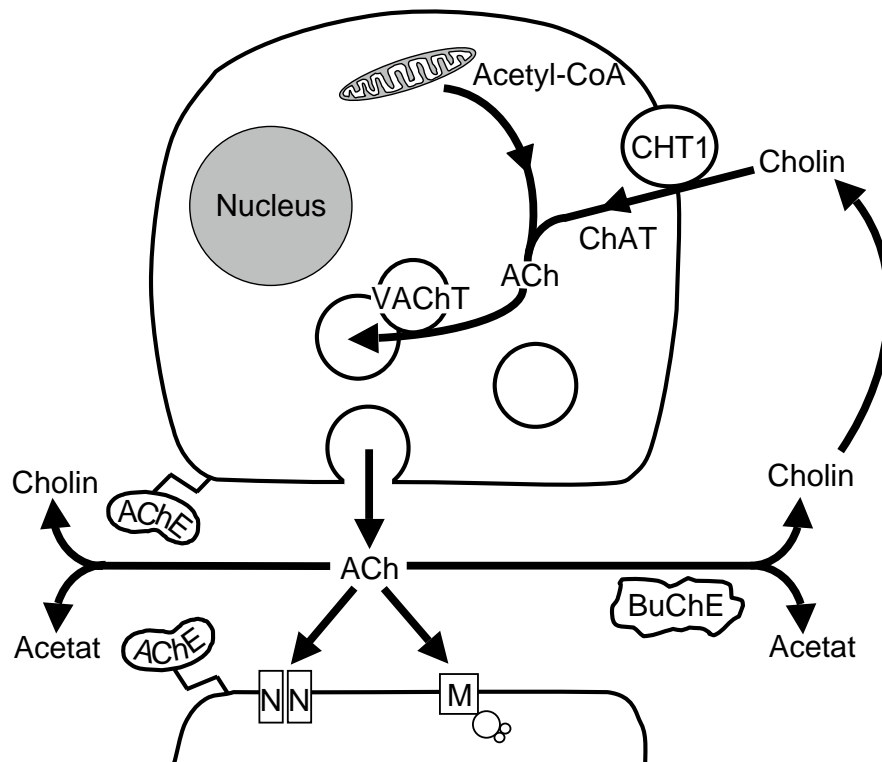


Abb. 1.1: ACh-Synthese, ACh-Freisetzung und ACh-Rezeptoren in neuronalen Zellen. ACh wird durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Das Acetyl-CoA kommt hierbei aus dem Mitochondrium, das Cholin wird mittels hochaffinem Cholintransporter (CHT1) in die Zelle transportiert. Der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACHT) transportiert ACh im Antiport mit H^+ -Ionen in Speichervesikel, die kalziumabhängig mit der Zellmembran verschmelzen und dadurch ACh freisetzen können. Im synaptischen Spalt kann ACh an zwei verschiedene Rezeptortypen binden: nikotinische und muskarinische ACh-Rezeptoren (nAChR, mAChR). Durch Cholinesterasen (AChE, BuChE) wird ACh in Acetat und Cholin gespalten. Cholin kann zur erneuten ACh-Synthese wieder in die Zelle aufgenommen werden.

des Mitochondriums zur Verfügung gestellt. Bisher wurden zwei Formen der ChAT beschrieben: die allgemeine Form cChAT (c = common), die erstmals im zentralen Nervensystem gefunden wurde (Nachmansohn & Machado 1943), und die periphere Form pChAT, die im peripheren Nervensystem vorkommt (Tooyama & Kimura 2000). Das essenzielle Cholin kann durch den ubiquitär verbreiteten niedrigaffinen, natriumunabhängigen Cholintransporter in die Zelle aufgenommen werden, der Cholin für die Phospholipidsynthese (Phosphatidylcholin) bereitstellt. Dies erfordert allerdings hohe Konzentrationen von Cholin. Für die ACh-Synthese ist ein Protein nötig, das Cholin auch bei niedrigen Konzentrationen transportiert. Der erste hochaffine, natriumabhängige Cholintransporter CHT1 wurde 2000 kloniert (Apparsundaram et al. 2000, Okuda et al. 2000). Diese Aufnahme des Cholin in die Zelle ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ACh-Synthese (Haga & Noda 1973).

1.1.2 Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin

Vesikulärer Acetylcholintransporter (VACHT)

In cholinergen Nervenendigungen (Abb. 1.1) wird ACh mittels VACHT im Antiport mit H^+ -Ionen in Vesikel transportiert und dort gespeichert. Die Vesikel verschmelzen kalziumabhängig mit der präsynaptischen Membran und setzen so ACh via Exozytose in den synaptischen Spalt frei (Anderson et al. 1983, Marshall & Parsons 1987, Erickson et al. 1994). Der Transportvorgang wird durch einen Protonengradienten über die Vesikelmembran ermöglicht, der durch eine vakuoläre ATPase (V-ATPase) unter ATP-Verbrauch aufgebaut wird (Parsons 2000). Entgegen früherer Untersuchungen konnte kürzlich gezeigt werden, dass nicht nur ACh, sondern auch Cholin ein Substrat von VACHT ist, jedoch mit einer siebenmal geringeren Affinität (Bravo et al. 2004). Durch Knockout (KO)-Studien an *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass ohne VACHT keine cholinerge Neurotransmission mehr stattfindet (Alfonso et al. 1993).

VACHT wurde 1994 in Mensch und Nagetier kloniert und charakterisiert (Erick-

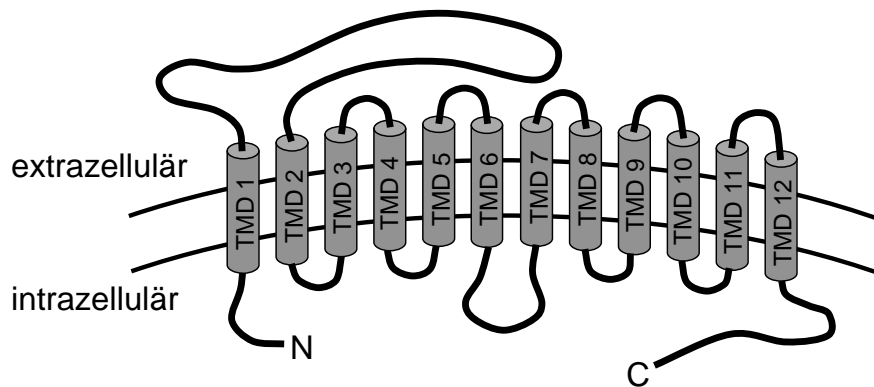


Abb. 1.2: Postulierte Sekundärstruktur von VACHT mit 12 Transmembrandomänen (TMD) und intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus. Zwischen TMD 1 und 2 liegt eine extrazelluläre Schleife mit drei Glykosylierungsstellen und zwischen den extrazellulären Schleifen TMD 1/2 und TMD 7/8 eine Cystein-Brücke. Modifiziert nach Eiden et al. (2004).

son et al. 1994). Das VACHT-Protein besteht aus 532 Aminosäuren (AS) mit 12 Transmembrandomänen (TMD, Abb. 1.2) und ist durch Vesamicol (Prior et al. 1992) hemmbar. Zwischen der ersten und zweiten Domäne wird eine glykosylierte Schleife vermutet (Kim et al. 1999) und zwischen den extrazellulären Schleifen 1/2 und 7/8 eine Cystein-Brücke postuliert (Thiriot et al. 2002). Aspartatreste in der ersten, zehnten und elften Domäne scheinen für die ACh-Erkennung (Merickel et al. 1995) und den ACh-Transport (Merickel et al. 1997), Aspartatreste in der vierten und zehnten Domäne für die Bindung von Vesamicol verantwortlich zu sein (Kim et al. 1999). In PC12-Zellen konnte gezeigt werden, dass das C-terminale Ende (AS 481-490) den Transport von VACHT in Mikrovesikel vermittelt (Varoqui & Erickson 1998, Krantz et al. 2000, Ferreira et al. 2005).

Das VACHT-Gen (Abb. 1.3) liegt auf Chromosom 10, ist 2421 Basenpaare (bp) lang und besitzt kein Intron. Es liegt im ersten Intron des ChAT-Gens zwischen den ersten beiden Exons. Diese ungewöhnliche Lokalisation wird als „cholinergischer Genloкус“ bezeichnet (Bejanin et al. 1994, Erickson et al. 1994). Aufgrund dieser Verschachtelung ging man lange davon aus, dass ChAT und VACHT koexprimiert

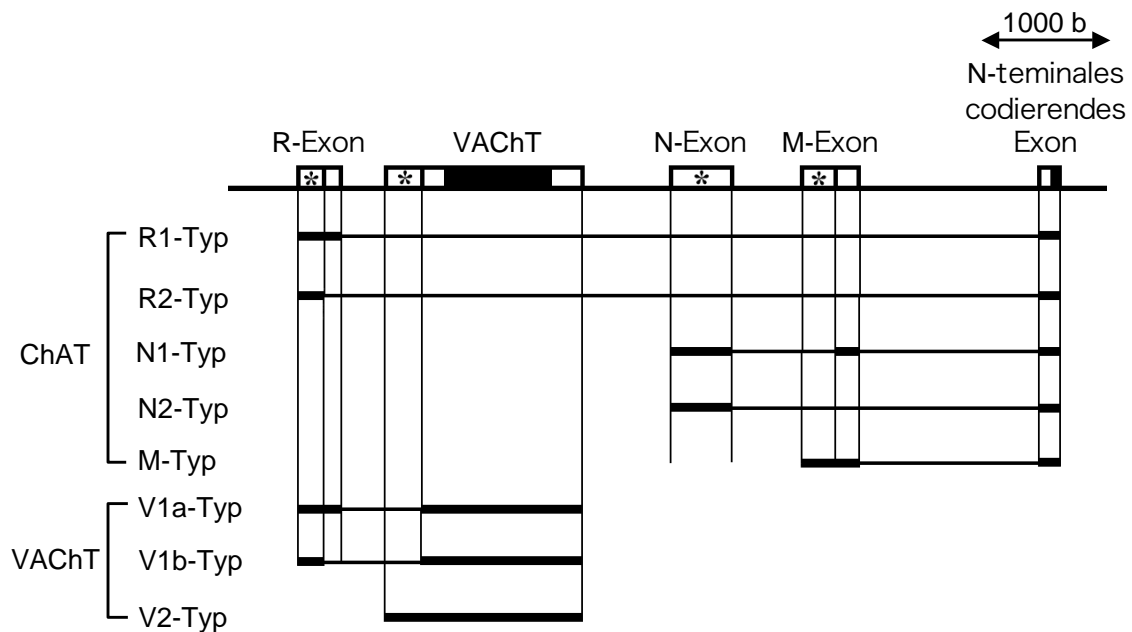


Abb. 1.3: Cholinerges Genlokus bei der Ratte. Schwarz gefüllte Boxen stellen kodierende, weiß gefüllte Boxen nicht-kodierende Gensequenzen dar. Das VACHT-Gen liegt zwischen dem R-Exon und dem N-Exon des ChAT-Gens. Sternchen in der obersten Linie markieren die Startpunkte für die Transkription der Gene. Abhängig vom Startpunkt existieren 3 Spleißvarianten der VACHT-mRNA. Modifiziert nach Misawa et al. (1995).

werden (Sylvie et al. 1995). Die Koexpression im neuronalen System scheint sich allerdings von der im non-neuronalen zu unterscheiden: In kultivierten sympathischen Neuronen (Misawa et al. 1995) und ebenso in cholinergen Neuronen des Ganglion pelvinum (Kaleczyc et al. 2003) konnte eine Koexpression gezeigt werden, während humane leukämische T-Zellen zwar ChAT, aber nicht VACHT exprimieren (Ogawa et al. 2003).

Mediatophor

Das Mediatophor ist ein 220 kDa großer Proteinkomplex, der sich aus fünf je 15 kDa großen Proteolipid-Untereinheiten (c) der vakuolären H^+ -ATPase (V-ATPase) zusammensetzt (Israel et al. 1986, Morel 2003). Am elektrischen Organ des Zitter-

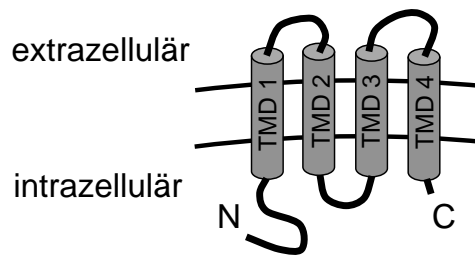


Abb. 1.4: Postulierte Sekundärstruktur der c-Untereinheit der V-ATPase mit 4 TMD und intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus. Modifiziert nach Bloc et al. (2000).

rochens (*Torpedo marmorata*) konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal zytoplasmatisches ACh in Abhängigkeit vom Kalziumeinstrom freisetzen kann (Israel & Lesbats 1981). Die 15 kDa große c-Untereinheit wurde 1990 kloniert: Sie setzt sich aus 154 AS zusammen und besteht aus vermutlich vier TMD (Abb. 1.4, Birman et al. 1990). Die c-Untereinheiten der V-ATPase sind nahezu ubiquitär vorhanden und können zelltypspezifisch als Mediatophor in die Zellmembran inseriert werden. Abhängig von seiner Konzentration kann das Mediatophor ACh über die Membran transportieren. Zellen, die viel Mediatophor enthalten (z. B. Gliom C6BU-1-Zellen), sind zur ACh-Freisetzung befähigt, Zellen mit geringem Mediatophorgehalt können dies erst nach Transfektion mit dem Torpedo-Mediatophor (Malo & Israel 2003). Das Mediatophor kann durch Cetidil gehemmt werden (Leroy et al. 1994). Eine höhere Proteolipidkonzentration scheint eine längere Öffnungszeit der Kanäle zu bedingen (Malo & Israel 2003).

1.1.3 Acetylcholin-Rezeptoren

Die ACh-Rezeptoren werden entsprechend ihrer Affinität zu den exogenen Liganden Nikotin bzw. Muskarin in nikotinische (nAChR) und muskarinische (mAChR) ACh-Rezeptoren eingeteilt.

Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR)

Der nAChR im elektrischen Organ des Zitterrochens war der erste Rezeptor eines Neurotransmitters, der kloniert und charakterisiert wurde (Mishina et al. 1984). Es werden zwei verschiedene Typen des nAChR unterschieden: 1. der „muskuläre Typ“, der dem nAChR des Zitterrochens verwandt ist und bei Vertebraten ausschließlich an der motorischen Endplatte vorkommt und 2. der „neuronale Typ“, der im zentralen und peripheren Nervensystem nachgewiesen werden konnte (Sargent 1993).

Im ZNS vermitteln die nAChR die cholinerge Neurotransmission und sind für die Regulation wichtiger physiologischer Vorgänge wie Transmitterfreisetzung, Zellerregbarkeit und neuronale Integration verantwortlich (Gotti & Clementi 2004, Wonnacott et al. 2005). An der postsynaptischen Membran vermitteln die nAChR das exzitatorische postsynaptische Potenzial (EPSP, Clarke 1993). Die nAChR befinden sich jedoch auch an der Präsynapse, wo sie synaptische und zelluläre Signalwege modulieren (Sharma & Vijayaraghavan 2002, Gahring & Rogers 2006). In Neuronen, die verschiedene Transmitter wie ACh, Noradrenalin, Dopamin, Glutamat und γ -Aminobuttersäure enthalten, wurden präsynaptische nAChR gefunden, die die Sekretion der jeweiligen Neurotransmitter regulieren sollen (Wonnacott et al. 1995, Wonnacott 1997). Nikotin beeinflusst die nAChR-Subtypen auf unterschiedliche Weise, was verschiedene Mechanismen bei der Kontrolle der nAChR-Expression vermuten lässt (Quik & McIntosh 2006). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in HEK-Zellen die Expression von $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren durch Nikotin hochreguliert wurde (Nelson et al. 2003), während im Gehirn der Ratte $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren durch eine chronische Nikotinexposition nicht beeinflusst (Nguyen et al. 2003) und $\alpha 6$ -haltige Rezeptoren im Striatum der Maus herunterreguliert wurden (Lai et al. 2005).

Die nAChR sind Ionenkanäle, die durch Komposition von fünf Untereinheiten zu Homo- oder Heteropentameren entstehen (Bertrand & Changeux 1995). 17 verschiedene nAChR-Untereinheiten wurden bisher beschrieben: zehn alpha-Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), vier beta-Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 4$) und jeweils eine gamma-

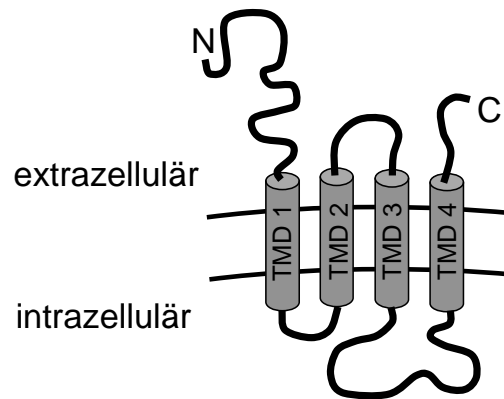


Abb. 1.5: Postulierte gemeinsame Sekundärstruktur der nAChR-Untereinheiten mit vier TMD und extrazellulär lokalisiertem N- und C-terminalem Ende. In der N-terminalen Domäne existiert zwischen zwei Cysteinresten, die eine Disulfidbrücke ausbilden, eine konservative Sequenz. Die intrazelluläre Schleife zwischen der dritten und vierten TMD enthält eine für die Untereinheiten spezifische Sequenz. Modifiziert nach Gotti & Clementi (2004).

(γ), delta- (δ) und epsilon- (ϵ) Untereinheit (Mamalaki & Tzartos 1994, Lindstrom et al. 1996, Elgoyhen et al. 2001). Die Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 1$, δ und ϵ werden dabei dem muskulären Typ zugeordnet und kommen in adulten Geweben vor, während die γ -Untereinheit nur in fötalem Gewebe und denerviertem Muskel gefunden wurde (Mishina et al. 1986). Der neuronale Typ des nAChR besteht aus den Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 10$ und $\beta 2$ - $\beta 4$. Jede Untereinheit besteht aus vier TMD mit extrazellulär lokalisiertem N- und C-terminalem Ende (Abb. 1.5). In der ca. 200 AS langen N-terminalen Domäne existiert zwischen zwei Cysteinresten, die eine Disulfidbrücke ausbilden, eine konservative Sequenz aus 13 AS (Gotti & Clementi 2004). Eine intrazelluläre Schleife zwischen der dritten und vierten TMD enthält eine AS-Sequenz, die für die Untereinheiten der nAChR spezifisch ist (Lukas et al. 1999).

In Säugetieren setzen sich die nAChR des neuronalen Typs aus den Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ - $\alpha 10$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ zusammen (McGehee & Role 1995), während die $\alpha 8$ -Untereinheit nur im Huhn gefunden wurde (Lindstrom 2000). Bisher wurden von

der enormen Vielfalt an Kombinationsmöglichkeiten aller nAChR-Untereinheiten vergleichsweise wenige beschrieben (Tabellen 1.1, 1.2).

Tabelle 1.1: α -BTX-sensitive Rezeptoren: Kombinationen der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ bei Wirbeltieren.

Kombinationen	Literaturstelle
$\alpha 7$	Couturier et al. 1990, Seguela et al. 1993
$\alpha 7\beta 2$	Khiroug et al. 2002
$\alpha 7\beta 3$	Palma et al. 1999
$\alpha 3\alpha 7\beta$	Yu & Role 1998
$\alpha 3\alpha 5\alpha 7\beta$	Yu & Role 1998
$\alpha 5\alpha 7\beta$	Crabtree et al. 1997
$\alpha 9$	Elgohyen et al. 2001, Sgard et al. 2002
$\alpha 9\alpha 10$	Elgohyen et al. 2001, Sgard et al. 2002

Wie auch bei anderen oligomeren Ionenkanälen ist die Zusammenstellung der Untereinheiten ein streng regulierter und geordneter Vorgang (Green & Millar 1995). Die verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten beeinflussen die Spezifität und Affinität zum Liganden, die Kationenpermeabilität und die Kinetik (Buisson et al. 2000). Durch Bindung eines aktivierenden Liganden (z. B. ACh, Nikotin, Carbachol) an den nAChR geht dieser vom geschlossenen, inaktiven Zustand in einen offenen, aktiven Zustand über und wird für Kationen durchlässig. Bei anhaltender Agonistenbindung nimmt die Affinität für den Agonisten ab, der Kanal schließt sich und wird refraktär. Die Übergänge zwischen aktivem, inaktivem und Refraktärzustand sind reversibel. Antagonisten der nAChR sind zum Beispiel Tubocurarin (Langley 1907), das unspezifisch auf alle α -Untereinheiten wirkt, und α -Bungarotoxin (α -BTX, Lee et al. 1972), das spezifisch auf den muskulären Typ der nAChR und die Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ wirkt (Davies et al. 1999, Sgard et al. 2002). Anhand dieser Sensitivität auf α -BTX können die neuronalen nAChR

Tabelle 1.2: α -BTX-insensitive Rezeptoren: Kombinationen der nAChR-Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 6$, $\beta 2$ - $\beta 4$ bei Wirbeltieren.

Kombinationen	Literaturstelle
$\alpha 2\beta 2$	Papke 1993, Zwart & Vijverberg et al. 1997
$\alpha 2\beta 4$	Papke 1993, Zwart & Vijverberg et al. 1997
$\alpha 3\beta 2$	Wang et al. 1996, Zwart & Vijverberg et al. 1997
$\alpha 3\beta 4$	Wang et al. 1996, Zwart & Vijverberg et al. 1997
$\alpha 4\beta 2$	Ramirez-Latorre et al. 1996, Fenster et al. 1999, Nelson et al. 2003
$\alpha 4\beta 4$	Zwart & Vijverberg et al. 1997
$\alpha 6\beta 2$	Gerzanich et al. 1997
$\alpha 6\beta 4$	Fucile et al. 1998
$\alpha 2\alpha 5\beta 2$	Balestra et al. 2000
$\alpha 3\alpha 5\beta 2$	Wang et al. 1996
$\alpha 3\alpha 5\beta 4$	Wang et al. 1996
$\alpha 3\alpha 6\beta 2$	Kuryatov et al. 2000
$\alpha 3\alpha 6\beta 4$	Fucile et al. 1998, Kuryatov et al. 2000
$\alpha 3\beta 3\beta 4$	Forsayeth & Kobrin 1997
$\alpha 4\alpha 5\beta 2$	Ramirez-Latorre et al. 1996, Lukas et al. 1999
$\alpha 5\alpha 6\beta 2$	Kuryatov et al. 2000
$\alpha 6\beta 2\beta 3$	Zoli et al. 2002
$\alpha 6\beta 3\beta 4$	Vailati et al. 1999, Kuryatov et al. 2000
$\alpha 3\alpha 5\beta 2\beta 4$	Conroy et al. 1995
$\alpha 3\alpha 6\beta 3\beta 4$	Vailati et al. 1999
$\alpha 4\alpha 5\alpha 6\beta 2$	Klink et al. 2001
$\alpha 4\beta 2\beta 3\beta 4$	Forsayeth & Kobrin 1997
$\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$	Gotti et al. 2005

in α -BTX-sensitive Rezeptoren (aus den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$) und α -BTX-insensitive Rezeptoren (aus den Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 6$, $\beta 2$ - $\beta 4$) eingeteilt werden (Dani 2001, Gotti & Clementi 2004).

Die α -BTX-sensitiven Rezeptoren sind in hohem Maße für bivalente Kationen wie Kalzium und Magnesium durchlässig, können aber auch monovalente Kationen wie Natrium und Kalium transportieren (Seguela et al. 1993, Lindstrom 2000). Sie tragen einen wichtigen Teil zum Kalziumhaushalt bei (Gotti & Clementi 2004). Die Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ sind die phylogenetisch ältesten nAChR-Untereinheiten (Tsunoyama & Gojobori 1998). Sie können sowohl funktionelle Homopentamere (Couturier et al. 1990, Elgoyhen et al. 1994) als auch Heteropentamere bilden (Yu & Role 1998, Elgohyen et al. 2001). Funktionelle Rezeptoren, die die Untereinheit $\alpha 10$ enthalten, konnten bisher nur in Kombination mit der $\alpha 9$ -Untereinheit nachgewiesen werden (Elgoyhen et al. 2001, Sgard et al. 2002). Diese $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptoren scheinen in einem stöchiometrischen Verhältnis von zwei $\alpha 9$ - zu drei $\alpha 10$ -Untereinheiten vorzuliegen (Plazas et al. 2005).

Die α -BTX-insensitiven nAChR bilden aus α - und β -Untereinheiten Heteropentamere, die aus zwei α -Untereinheiten und drei β -Untereinheiten (z. B. $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$, $(\alpha 3)_2\beta 3(\beta 4)_2$) zusammengesetzt sind, wie stöchiometrische Untersuchungen zeigen (Cooper et al. 1991, Boorman et al. 2000). Diese Heteropentamere sind für monovalente Kationen wie Natrium stärker permeabel als für bivalente Kationen wie Kalzium (Lukas et al. 1999). ACh bindet an die α -Untereinheiten, weshalb die homomeren Rezeptoren über jeweils fünf identische ACh-Bindungsstellen und die heteromeren Rezeptoren (zwei α - und drei β -Untereinheiten) über zwei ACh-Bindungsstellen verfügen (Abb. 1.6).

Die hohe Variabilität der nAChR, die aus den verschiedenen Untereinheit-Kombinationen resultiert, zeigt sich nicht nur in den weit gefächerten physiologischen Funktionen, sondern auch in einer Fülle von neurologischen Erkrankungen (Epilepsie, Schizophrenie, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson u. a.), die sich teilweise auf die Dysfunktion einzelner Untereinheiten zurückführen lassen (Gotti & Clementi 2004). Zum Beispiel konnte für die autosomal dominante nächtliche

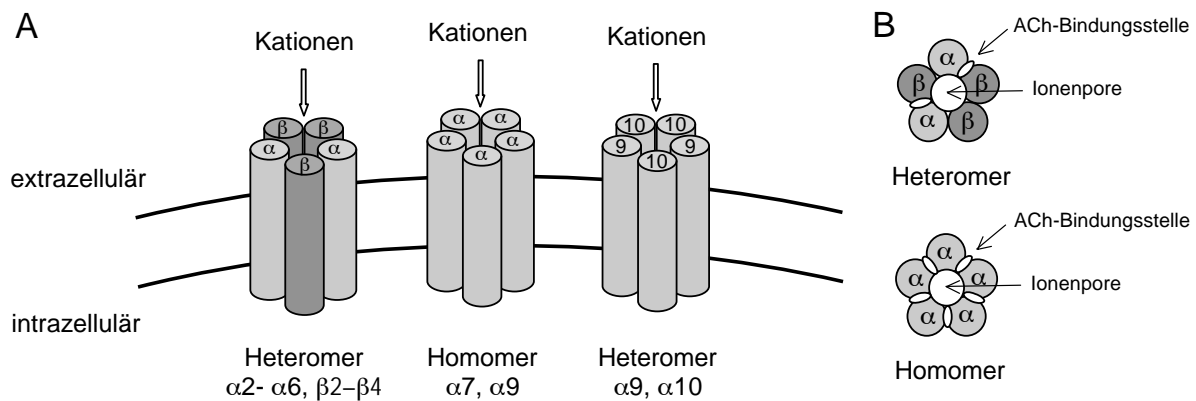


Abb. 1.6: (A) Formation der nAChR-Untereinheiten zu Rezeptoren. Heteromere aus zwei α - und drei β -Untereinheiten ($\alpha 2$ - $\alpha 6$, $\beta 2$ - $\beta 4$) sind vor allem für Natrium permeabel. Homomere aus den Untereinheiten $\alpha 7$ oder $\alpha 9$ und α -Heteromere aus zwei $\alpha 9$ - und drei $\alpha 10$ -Untereinheiten sind vor allem für Kalzium permeabel. (B) ACh-Bindungsstellen an den α -Untereinheiten. Heteromere Rezeptoren besitzen zwei, homomere Rezeptoren fünf ACh-Bindungsstellen. Modifiziert nach Gotti & Clementi (2004).

Frontallappenepilepsie ein Gendefekt auf dem Chromosom (20q13.2-13.3) nachgewiesen werden, welches auch für das $\alpha 4$ -Gen kodiert (Phillips et al. 1995). In Familien mit dieser Epilepsieform wurden Mutationen des $\alpha 4$ -Gens beschrieben (Steinlein et al. 1995, 1997).

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR)

Muskarinische ACh-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, die die postganglionäre Erregungsübertragung parasymphathischer Neurone an den Erfolgsorganen vermitteln. Nach Binden eines Liganden wie ACh oder Muskarin an den G-Proteingekoppelten Rezeptor werden intrazelluläre Signalkaskaden über die „second messenger“ cAMP (M2 und M4) und IP_3 /DAG (M1, M3 und M5) aktiviert (Caulfield & Birdsall 1998). Es sind die fünf Subtypen M1-M5 des mAChR bekannt, deren Gene beim Menschen auf verschiedenen Chromosomen liegen und bei Säugern hohe Homologien aufweisen (Saffen et al. 1999).

1.1.4 Abbau von Acetylcholin

Zur Inaktivierung spalten Cholinesterasen ACh in Cholin und Acetat. Diese Enzyme kommen ubiquitär in neuronalen und non-neuronalen Geweben im Intra- und Extrazellulärraum vor (Wessler et al. 1998). Die Acetylcholinesterase (AChE) zeigt bei niedrigen ACh-Konzentrationen eine starke Aktivität, während andere Cholinesterasen wie die Butyrylcholinesterase ACh nur bei hohen ACh-Konzentrationen abbauen können (Koelle 1950).

1.1.5 Die Neuroblastomzelllinie NS20Y

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuronale Zelllinie verwendet, um die molekularen Komponenten des cholinergen neuronalen Systems zu untersuchen. Die Zelllinie NS20Y ist ein cholinerges Subklon der Neuroblastom-C1300-Zelllinie der Maus. Die Neuroblastomzellen wuchsen 1940 spontan und enthalten mehr Chromosomen als normale diploide Zellen der Maus (bei cholinergen Klonen zwischen 59 und 118 Chromosomen, Hauschka et al. 1956). Sie zeichnen sich durch eine schnelle in-vitro-Vermehrung aus und besitzen viele charakteristische Eigenschaften differenzierter Neurone. Die NS20Y-Zelllinie exprimiert außerdem die ChAT (Amano et al. 1972), so dass sie für unsere Untersuchungen als typischer Vertreter einer cholinergen neuronalen Zelle diene.

1.2 Das cholinerge System in non-neuronalen Zellen

In Säugetieren wurde ACh im non-neuronalen System erstmals 1966 in der Plazenta beschrieben (Morris 1966). Die Tatsache, dass ACh auch in Bakterien, Pilzen und niederen Pflanzen nachgewiesen wurde, also im Laufe der Evolution schon sehr früh eine Rolle spielt, weist darauf hin, dass es auch in non-neuronalen Geweben eine weite Verbreitung findet (Wessler et al. 1998). Bisher wurde non-neuronal synthetisiertes ACh und/oder das Syntheseeenzym ChAT bei Mensch und Ratte zum Beispiel in Epithelzellen (Klapproth et al. 1997, Nguyen et al. 2000), Endothelzellen (Parnavelas et al. 1985, Haberberger et al. 2000), Mesothelzellen

(Klapproth et al. 1997), immunkompetenten Zellen (Fujii et al. 1996, Ogawa et al. 2003) und glatten Muskelzellen (Wessler & Kirkpatrick 2001) nachgewiesen. Es wird vermutet, dass ACh im non-neuronalen System als autokrines oder parakrines Hormon (Proskocil et al. 2004) an der Regulation vieler Zellfunktionen wie Mitose, Zilienschlag, Zell-Zell-Kontakt, Barrierefunktion, Immunfunktion und Trophik beteiligt ist (Grando 1997, 2006, Wessler et al. 1998, Kawashima & Fujii 2000, Fujii et al. 2008). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die molekularen Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems zum großen Teil denen des neuronalen cholinergen Systems entsprechen (Sastry & Sadavongvivad 1978, Klapproth et al. 1997, Kawashima & Fujii 2000, Haberberger et al. 2002, Pfeil et al. 2003, 2004, Kawashima et al. 2007).

1.2.1 Synthese von Acetylcholin

Auch in non-neuronalen Geweben kann ACh durch das Syntheseeenzym ChAT synthetisiert werden (Wessler et al. 1998, 2003). Am denervierten Skelettmuskel wurde jedoch gezeigt, dass auch die Carnitinacetyltransferase (CarAT), die im Mitochondrium ein wichtiges Enzym des Fettstoffwechsels darstellt, zur ACh-Synthese befähigt ist (Tucek 1982). Der Cholintransporter CHT1 kommt ebenfalls in einigen non-neuronalen Geweben vor. CHT1 konnte im Epithel von Haut, Atemwegen und Harnblase (Haberberger et al. 2002, Pfeil et al. 2003, Proskocil et al. 2004, Hanna-Mitchell et al. 2007), in der Gefäßwand (Lips et al. 2003) und in T-Lymphozyten (Fujii et al. 2003) nachgewiesen werden.

1.2.2 Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin

In der humanen Plazenta, die nicht cholinerg innerviert ist (Sastry & Sadavongvivad 1978), zeigten Rowell & Sastry (1981), dass ACh in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Zur Freisetzung von ACh im non-neuronalen Gewebe werden derzeit mehrere Mechanismen diskutiert. Einerseits scheint auch hier die VACHT-vermittelte Speicherung von ACh in Vesikeln und anschließende Freisetzung mittels Exozytose möglich zu sein (Haberberger et al. 2000, Kirkpatrick et al. 2001,

Pfeil et al. 2004). Andererseits wurde gezeigt, dass auch membranständige Transportsysteme wie das Mediatophor (Israel et al. 1979) oder die organischen Kationentransporter (OCT, Wessler et al. 2001, Lips et al. 2005, Kummer et al. 2006) ACh kontinuierlich ohne vorherige Speicherung direkt aus dem Zytoplasma freisetzen können (Abb. 1.7).

Vesikulärer Acetylcholintransporter

VACHT wurde 2000 erstmals in einem non-neuronalen Gewebe beschrieben: Im Endothel der Arteria pulmonalis wurde VACHT-mRNA (Haberberger et al. 2000) und VACHT-Protein (Kirkpatrick et al. 2001) nachgewiesen. Ebenso kommt VACHT-mRNA und -Protein in Teilen der Plazenta (Trophoblast, mesenchymale Zellen und Dottersackepithel) vor (Pfeil et al. 2004). Im Respirationstrakt wurde VACHT im Alveolarepithel (Proskocil et al. 2004) und den sekretorischen Zellen des Trachealepithels (Lips et al. 2005) gefunden.

Mediatophor

Über das Vorkommen des Mediatophor in non-neuronalen Zellen ist bis jetzt wenig bekannt. Israel et al. entwickelten eine Methode zum indirekten Nachweis des Mediatophor, indem Zelllinien mit ACh beladen wurden (Israel et al. 1994) und eine anschließende ACh-Freisetzung mittels Chemolumineszenz-ACh-Assay (Israel & Lesbats 1981) gemessen wurde. So wurden in einigen Zelllinien wie Fibroblasten (LTK), Gliomzellen (C6BU-1) und cerebralen Endothelzellen (RBE4) eine schubweise Freisetzung von ACh gemessen (Malo & Israel 2003). Diese Freisetzung soll Mediatophor-vermittelt sein, da sie unabhängig von der VACHT-vermittelten Exozytose stattfindet (Dan & Poo 1992, Israel et al. 1994, Falk-Vairant et al. 1996).

Organische Kationentransporter

Da ACh selbst ein organisches Kation ist, kann es durch die weit verbreiteten OCT transportiert werden. Die OCT sind polyspezifisch und lassen sich durch

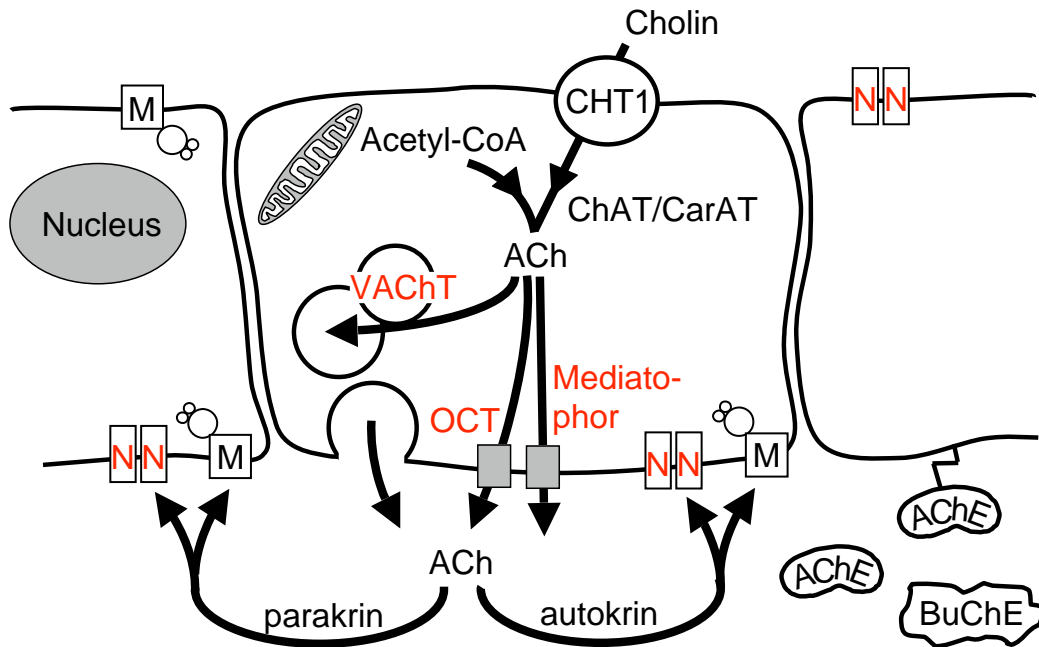


Abb. 1.7: ACh-Synthese, ACh-Freisetzung und ACh-Rezeptoren in non-neuronalen Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Komponenten sind rot dargestellt. ACh wird durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) oder durch die Carnitinacetyltransferase (CarAT) aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Wie in neuronalen Zellen kann ACh mittels vesikulärem Acetylcholintransporter (VACHT) in Vesikeln gespeichert und exozytotisch freigesetzt werden. Alternativ kann ACh ohne vorherige Speicherung auch durch das membranständige Mediatophor oder durch die organischen Kationentransporter (OCT) aus der Zelle ausgeschleust werden. Als auto- bzw. parakriner Mediator kann ACh an nikotinische und muskarinische ACh-Rezeptoren (nAChR, mAChR) binden, die an der eigenen Zellmembran oder der Membran benachbarter Zellen lokalisiert sind. Durch Cholinesterasen (AChE, BuChE) wird ACh in Acetat und Cholin gespalten.

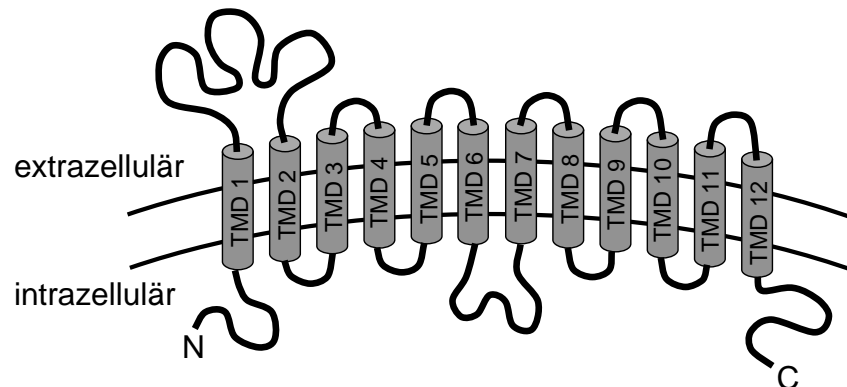


Abb. 1.8: Postulierte gemeinsame Sekundärstruktur der organischen Kationentransporter OCT1-3 mit 12 vermutlich α -helicalen TMD und intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus. Zwischen TMD 1 und 2 liegt eine große hydrophile extrazelluläre Schleife mit mehreren Glykosylierungsstellen. Mehrere Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen befinden sich vermutlich intrazellulär. Modifiziert nach Koepsell & Endou (2004).

eine Vielzahl von Substraten wie Corticosteron (Hayer-Zillgen et al. 2002) und Chinin (Wessler et al. 2001) inhibieren und haben gemeinsam, dass sie kleine hydrophile Substanzen (im Bereich von etwa 60 bis 350 Da) 1. elektrogen, 2. natriumunabhängig und 3. bidirektional transportieren. Sie spielen bei der Aufnahme und Abgabe von Pharmaka, Xenobiotika und endogenen Substanzen in Verdauungstrakt, Leber und Niere eine wichtige Rolle und üben in Gehirn und Herz homöostatische Funktionen aus (Koepsell & Endou 2004). Die OCT gehören zur „solute carrier 22“-Familie (SLC22) der organischen Iontentransporter, die die Kationentransporter OCT1 (SLC22A1), OCT2 (SLC22A2) und OCT3 (SLC22A3) und neun weitere Transporter umfassen. Die OCT kommen in der Plasmamembran von Epithelzellen vor und bestehen aus 12 TMD mit einer hydrophilen extrazellulären Schleife und mehreren Glykosylierungsstellen zwischen TMD 1 und 2 (Abb. 1.8, Koepsell 1998, Meyer-Wentrup et al. 1998, Dresser et al. 1999, Ciarimboli & Schlatter 2005).

OCT1 wurde 1994 als erster Transporter in der Niere der Ratte (rOCT1) kloniert (Gründemann et al. 1994). Zwei Jahre später konnte das OCT1-Gen in der Maus (mOCT1) kloniert und eine Expression in Leber, Niere und Intestinum nachgewiesen werden (Schweifer & Barlow 1996). Beim Menschen kommt OCT1 (hOCT1) vor allem in der Membran der Lebersinus, bei Nagetieren vor allem in der Niere, aber auch in Leber, Dünn- und Dickdarm, Haut und Milz vor. Das 1870 bp lange mOCT1-Gen liegt auf Chromosom 17 und kodiert für ein Membranprotein, das aus 556 AS besteht und aus 12 TMD aufgebaut ist. mOCT1 ist zu 95% mit rOCT1 identisch (Green et al. 1999). Substrate für OCT1 sind Kationen wie Tetraethylammonium (TEA), das Neurotoxin Methylphenylpyridin (MPP), Chinin, endogene Substrate wie Cholin, Serotonin, Histamin oder Prostaglandine und einige Medikamente wie Desipramin, Aciclovir und Metformin (Koepsell & Endou 2004).

Für die Freisetzung von ACh in epithelialen Geweben konnte gezeigt werden, dass in der humanen Plazenta OCT1 und OCT3 ACh transportieren (Wessler et al. 2001), während im Bronchialepithel der Ratte OCT1 und OCT2 für die ACh-Freisetzung verantwortlich sind (Lips et al. 2005), was bei Studien mit OCT1/2-Doppel-KO-Mäusen bestätigt wurde (Kummer et al. 2006). Die Untersuchungen zur Regulation von rOCT1 ergaben, dass die Expression von OCT1 durch PKC, PKA und Tyrosinkinase stimuliert und durch cGMP gehemmt wird (Mehrens et al. 2000, Schlatter et al. 2002). Räumlich getrennte Cluster von funktionell wichtigen AS-Resten konnten bei rOCT1 in der vierten TMD für die Bindung von TEA und MPP und bei rOCT1 und rOCT2 in der zehnten TMD für die Inhibition durch Corticosteron verantwortlich gemacht werden (Gorboulev et al. 2005, Popp et al. 2005). Bei Studien mit OCT1-KO-, OCT2-KO- und OCT1/2-Doppel-KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass OCT1 und OCT2 eine wichtige Rolle in der Pharmakokinetik, insbesondere bei der Aufnahme von Substraten in die Leber und intestinaler Sekretion (OCT1) und bei der renalen Sekretion (OCT1 und OCT2) spielen (Jonker et al. 2001, 2003, Müller et al. 2005). OCT1 und OCT2 sind essenziell für die renal-tubuläre Sekretion des Modellkations TEA und es ist der Transport vieler

physiologisch relevanten endogenen Komponenten beschrieben. Bei Abwesenheit von OCT1 oder OCT2 ließen sich daher physiologische Konsequenzen erwarten, die jedoch bei den KO-Typen nicht beobachtet wurden. Dies lässt vermuten, dass diese wichtigen Funktionen von anderen redundanten Transportern kompensiert werden können (Jonker et al. 2003).

OCT2 wurde 1996 in der Niere der Ratte (rOCT2) kloniert (Okuda et al. 1996). In der Maus wurde OCT2 (mOCT2) von Mooslehner & Allen (1999) identifiziert und charakterisiert. Das mOCT2-Gen ist zu 92% mit rOCT2 und zu 70% mit mOCT1 identisch und liegt ebenfalls auf Chromosom 17, woraus geschlossen wird, dass mOCT1 und mOCT2 aus einem gemeinsamen SLC22A-Gen entstanden sind (Mooslehner & Allen 1999, Eraly et al. 2004). Das 2137 bp lange mOCT2-Gen kodiert in einer 1659 bp langen Region für ein Membranprotein, das aus 553 AS besteht und aus 12 TMD aufgebaut ist. Trotz der Nähe vom mOCT2- zum mOCT1-Gen besitzen die Gene verschiedene Promotoren und damit auch unterschiedliche Expressionsmuster: Zwar kommen beide Transporter in der Niere vor, aber mOCT2 wird nicht wie OCT1 in der Leber exprimiert und konnte außerdem im Gehirn nachgewiesen werden (Mooslehner & Allen 1999). In Mensch und Ratte wird OCT2 vor allem in der Niere in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus, aber auch in Neuronen des ZNS, Thymus und Plexus choroideus exprimiert. Substrate für OCT2 stellen z. B. TEA, MPP, Cholin, biogene Amine (Dopamin, Histamin, Noradrenalin, Serotonin), Antiparkinsonmittel und Cimetidin dar (Koepsell & Endou 2004). Obwohl die Affinität einiger Substrate wie z. B. TEA für OCT1 und OCT2 fast gleich ist, interagieren die Transporter mit anderen Stoffen, wie z. B. Cimetidin, sehr unterschiedlich (Arndt et al. 2001, Zhang et al. 2002, Kaewmokul et al. 2003). Diese unterschiedliche Selektivität scheint Folge einer kleinen Anzahl an AS-Resten zu sein, die sich in OCT1 und OCT2 unterscheiden, z. B. die Expression eines Glutamatrestes in OCT2 statt eines Glutaminrestes in OCT1. Es wird vermutet, dass die Interaktion von Substraten und Inhibitoren mit OCT2 bzw. OCT1 nicht an einem einzelnen Bindungsort stattfindet, sondern an einer vergleichsweise großen Oberfläche mit vielen, teilweise

überlappenden Bindungsstellen. Dadurch wäre das gleichzeitige Binden vieler Substrate mit deren gegenseitiger Beeinflussung möglich (Ciarimboli et al. 2005, Gorboulev et al. 2005, Popp et al. 2005, Zhang et al. 2005).

Da viele kationische Medikamente über die Niere ausgeschieden werden, könnte eine zusätzliche Gabe von Substraten bzw. Inhibitoren von OCT2 die Wirksamkeit, aber auch Toxizität dieser Medikamente beeinflussen (Koepsell & Endou 2004, Biermann et al. 2006). Kürzlich wurde an rOCT2 die Vermutung aufgestellt, dass die Ligandenbindung und der tatsächliche Transport eines Substrates nicht unbedingt aufeinander folgen muss. Vielmehr seien einerseits die Bindung von Substraten an der polyspezifischen, großen Bindungsstelle und andererseits der Selektivitäts-Filter, der die Transportrate bestimmt, strukturell getrennte Komponenten (Schmitt & Koepsell 2005). Humaner OCT2 (hOCT2) kann durch den Kalzium/Calmodulin-Komplex aktiviert und durch Carbachol, einen Agonisten am mAChR, gehemmt werden (Koepsell & Endou 2004). Bei der Ratte wird eine Rolle von Testosteron bei der Regulation vermutet, da gezeigt werden konnte, dass die renale Expression von OCT2 in männlichen Tieren viermal höher ist als in weiblichen Tieren und bei gonadektomierten männlichen Ratten die Expression der weiblichen entspricht (Slitt et al. 2002). Diese Beobachtung kann allerdings nicht unbedingt auf andere Spezies übertragen werden, da z. B. beim Kaninchen kein Geschlechtsunterschied festgestellt werden konnte (Groves et al. 2006).

OCT3 wurde 1998 in der Plazenta der Ratte (rOCT3) kloniert (Kekuda et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass OCT3 identisch mit dem extraneuronalen Monoamintransporter (EMT) ist (Gründemann et al. 1998, Wu et al. 1998), dessen Funktion als spezifischer Transporter von Monoaminen beschrieben ist (Trendelenburg 1988) und durch Corticosteroide gehemmt werden kann (Wu et al. 1998). In der Maus wurde OCT3 (mOCT3) in Plazenta und Niere kloniert und seine Lage auf Chromosom 17 in der Nähe von mOCT1 und mOCT2 nachgewiesen, was eine gemeinsame Herkunft aller drei OCT wahrscheinlich macht (Verhaagh et al. 1999, Wu et al. 2000). Im Gegensatz zu OCT1 und OCT2 zeichnet sich OCT3 durch eine weite Verbreitung in Geweben wie Plazenta, humaner Leber, Skelettmuskulatur,

Niere, Herz, Gehirnrinde und Intestinum aus (Gründemann et al. 1998, Kekuda et al. 1998, Verhaagh et al. 1999). Das mOCT3-Gen besteht aus elf Exons und zehn Introns und kodiert in einer 1656 bp langen Region für ein Membranprotein mit 12 TMD. Das Protein, das aus 551 AS besteht, hat eine berechnete Masse von 61 kDa und ist zu 98% mit rOCT3 identisch. Die AS-Sequenzen von mOCT3 sind zu 47-50% identisch mit mOCT1 und mOCT2 und weitere 66-68% sind ähnlich (Verhaagh et al. 1999, Wu et al. 2000). OCT3 hat eine Vielzahl an Substraten mit OCT1 und OCT2 gemeinsam, so z. B. TEA, Guanidin und einige biogene Amine.

In Neuronen und im Herzen reguliert OCT3 die interstitielle Katecholamin-konzentration, eine Rolle von OCT3 bei der biliären Exkretion wird vermutet. Während der Transporter im humanen Intestinum für die Aufnahme von Kationen (Müller et al. 2005) und in der Plazenta für die ACh-Freisetzung (Wessler et al. 2001) verantwortlich sein soll, ist ACh in OCT3-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten kein Substrat von OCT3 (Lips et al. 2005). Aufgrund der Lokalisation von OCT3 im Herzen könnten OCT3-Inhibitoren die Kardiotoxizität kationischer Medikamente senken. Auch in der Plazenta, wo OCT3 in der materno-fetalen Passage mitwirkt, könnten bei Medikamenteneinnahme der Mutter OCT3-Inhibitoren gegen fetale Intoxikationen eingesetzt werden (Koepsell & Endou 2004). Bei OCT3-KO-Mäusen wurde kein offensichtlicher physiologischer Defekt oder eine Imbalance monoaminer Neurotransmitter gefunden (Zwart et al. 2001), was mit einer Übernahme dieser wichtigen Funktionen durch die anderen OCT erklärt wird (Jonker & Schinkel 2004).

In der Plazenta zeigten Wessler et al. (2001) indirekt, dass die ACh-Freisetzung sowohl durch Inhibitoren der OCT (z. B. Chinin, Corticosteron) als auch durch OCT-Antisense-Oligonukleotide gehemmt wurde. In *Xenopus*-Oozyten wurde mittels elektrophysiologischer Messungen nach Transfektion mit OCT1 und OCT2 direkt ein ACh-Transport nachgewiesen, der durch Corticosteroide gehemmt werden konnte (Lips et al. 2005). Im Bronchialepithel der Maus beschreiben Kummer et al. (2006) einen im Vergleich zum Wildtyp zweifach erhöhten ACh-Gehalt in OCT1/2-Doppelknockout-Mäusen, was im Atemwegsepithel ebenfalls auf eine

ACh-Freisetzung durch OCT schließen lässt.

1.2.3 Acetylcholin-Rezeptoren

Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

In non-neuronalen Zellen kommt der neuronale Typ des nAChR vor. Eine Ausnahme bildet die motorischen Endplatte, an der die neuromuskuläre Erregungsübertragung über nAChR vom muskulären Typ vermittelt wird. In kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte jedoch gezeigt werden, dass in diesen non-neuronalen Zellen auch die nAChR-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\beta 1$ des muskulären Typs exprimiert werden (Carlisle et al. 2007). In Urothelzellen (Beckel et al. 2006), Keratinozyten (Grando et al. 1995, Zia et al. 2000), Darmepithelzellen (Wessler et al. 1998), Bronchialepithelzellen (Conti-Fine et al. 2000), Endothelzellen (Macklin et al. 1998, Brüggmann et al. 2002), glatten Muskelzellen (Brüggmann et al. 2002), Skelettmuskulatur (Sala et al. 1996), Plazenta (Lips et al. 2005) und Lymphozyten (Benhammou et al. 2000, Fujii et al. 2008) wurden nAChR-Untereinheiten nachgewiesen.

Die nAChR wirken wie im neuronalen System über den Anstieg des intrazellulären Natrium- oder Kalziumspiegels. In ihrer Verteilung über das Gewebe unterscheiden sie sich allerdings. Während an Synapsen nAChR in sogenannten „hot spots“ angereichert sind, ist in non-neuronalen Zellen eine gleichmäßige Verteilung zu beobachten, was auf einen langsamen, kontinuierlichen Einfluss von ACh auf die Regulation grundlegender Zellfunktionen hinweist (Wessler et al. 2003). Da eine direkte Wirkung der nAChR auf metabolische und trophische Zellfunktionen unwahrscheinlich ist, wird vermutet, dass ein Mediator zwischen dem Rezeptor und der Zelle vermittelt. In dieser Signalübermittlung scheint Kalzium die Hauptrolle zu spielen (Sharma & Vijayaraghavan 2002).

Die Funktion der nAChR wird in der Haut unter anderem in der Ausbildung einer Schutzbarriere (Burkhart & Burkhart 2001), der Keratinozytenadhäsion (Grando 2006) und -differenzierung (Arredondo et al. 2002) gesehen. In der Lunge

wurde bei Untersuchungen von pränataler Nikotinexposition gezeigt, dass nAChR bei der Lungenentwicklung eine Rolle spielen (Sekhon et al. 2001). In humanen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, in denen nAChR gefunden wurden (Song et al. 2003, Song & Spindel 2008), könnten Acetylcholin und insbesondere der exogene Ligand Nikotin über die nAChR das Tumorstadium beeinflussen (Dasgupta et al. 2006, Carlisle et al. 2007). Tournier et al. (2006) konnten nachweisen, dass einige Untereinheiten des nAChR im Bronchialepithel an der Wundheilung beteiligt sind. Im Urothel der Ratte zeigten Beckel et al. (2006) mittels Kalzium-Imaging, dass in den Urothelzellen nachgewiesene nAChR-Untereinheiten funktionell aktive Rezeptoren bilden können. Jedem der Rezeptor-Subtypen werden spezifische elektrophysiologische Eigenschaften zugeschrieben: Die $\alpha 7$ -haltigen Rezeptoren sollen während der Füllung der Harnblase inhibitorisch auf den M. detrusor wirken, während $\alpha 3$ -haltige exzitatorische Rezeptoren die Harnblasenkontraktion vermitteln sollen (Beckel et al. 2006).

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Die Subtypen M1-M5 des mAChR sind auch in non-neuronalen Geweben wie Plazenta (Tayebati et al. 1998), Ovar (Mayerhofer & Fritz 2002), Haut (Haberberger & Bodenbenner 2000), Lymphozyten (Kawashima & Fujii 2003), Atemwegsepithel (Metzen et al. 2003) und Auge (Duncan & Collison 2003) weit verbreitet. In der Harnblase wurden M2- und M3-Rezeptoren gefunden, wobei die M3-Rezeptoren hauptsächlich für die Kontraktion des M. detrusor verantwortlich sind (Hegde & Eglen 1999, Fetscher et al. 2002). Antimuskarinerge Medikamente werden erfolgreich in der Behandlung der Detrusorhyperaktivität (OAB = overactive bladder) eingesetzt (Andersson et al. 2002). Allerdings wurden auch in den non-neuronalen Anteilen der Harnblase mAChR gefunden: Im Urothel wurden mAChR in einer 40% höheren Rezeptordichte im Vergleich zum M. detrusor nachgewiesen (Hawthorn et al. 2000, Zarghooni et al. 2007).

1.2.4 Abbau von Acetylcholin

Genauso wie im neuronalen System wird ACh auch in non-neuronalen Geweben durch Spaltung in Cholin und Acetat mittels Cholinesterasen (AChE, BuChE) abgebaut. Durch diese schnelle Inaktivierung ist die Wirkung des ACh auf die Region seiner Synthese und Freisetzung beschränkt.

1.2.5 Die Harnblase

Aufbau, Struktur und Funktion der Harnblase

Die Harnblase ist ein muskulöses Hohlorgan, das als Reservoir für den Harn dient. Im histologischen Feinbau lassen sich von luminal nach basal verschiedene Schichten differenzieren: Die Tunica mucosa mit Urothel und Lamina propria, die Tunica muscularis und die Tunica serosa, die mit einschichtigem Mesothel Teile der Harnblase überzieht (Kriz 2003, Abb. 1.9).

Das Übergangsepithel (= Urothel), welches die Harnblase auskleidet, stellt eine Schutzbarriere zum Harn dar und ist mit vielfältigen sensorischen und sekretorischen Komponenten ausgestattet (de Groat 2006). Die Lamina propria ist ein lockeres, zellarmes Gewebe, das Gefäße und Nerven führt und als Verschiebeschicht dient. Bei kontrahierter Harnblase ermöglicht die Lamina propria eine ausgeprägte Faltenbildung der Schleimhaut. Bei zunehmendem Füllungszustand der Harnblase ist die Mucosa gegenüber der darunterliegenden Muskelschicht verschieblich (Kriz 2003). Eine Ausnahme bildet der Bereich des Trigonum vesicae, in dem Mucosa und Muskulatur fest miteinander verwachsen sind. In der kräftigen Muskelschicht lässt sich eine Dreischichtung von innerer Längs-, mittlerer Ring- und äußerer Längsmuskelschicht erkennen. Man unterscheidet den M. detrusor vesicae, der den Hauptteil der Muskulatur ausmacht, von der schwächeren Trigonummuskulatur. Zwischen den Muskelschichten liegen zahlreiche vegetative Ganglien. Im dorsalen Bereich ist die Harnblase von einschichtigem Peritonealmesothel überzogen (Kriz 2003).

Die Funktion der Harnbase setzt sich zusammen aus der Reservoirfunktion

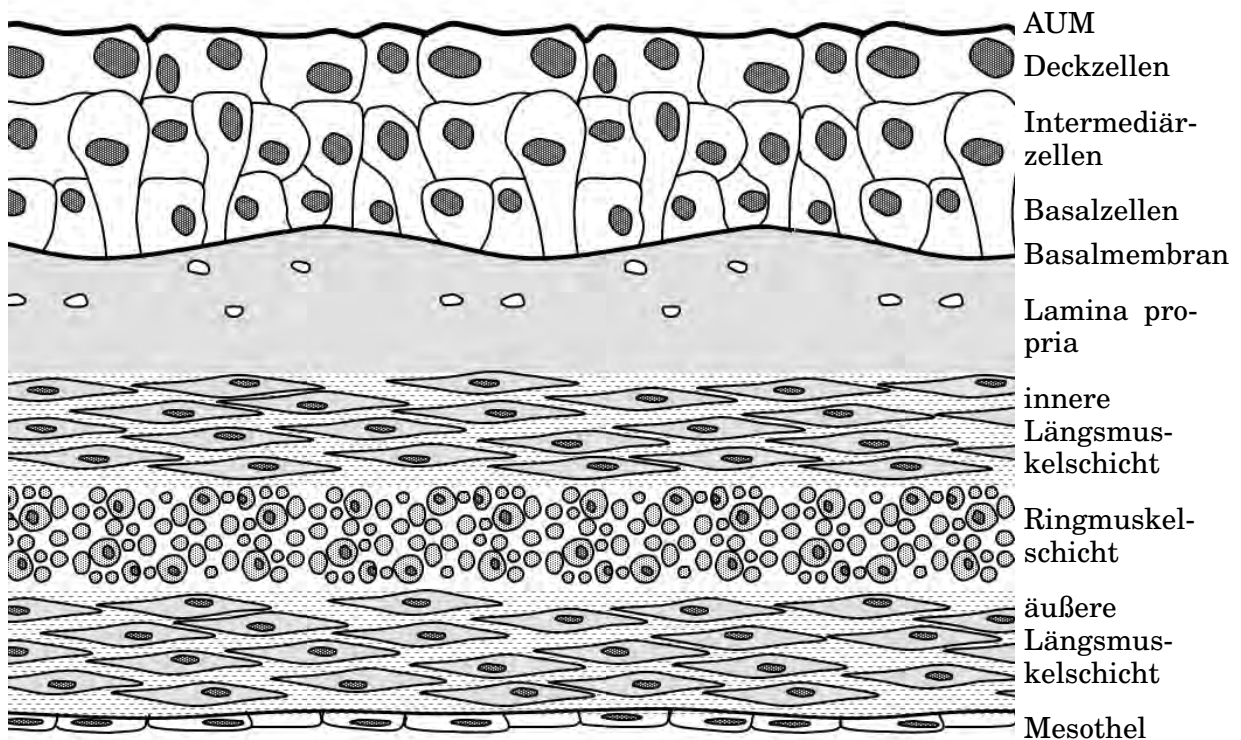


Abb. 1.9: Schema des histologischen Feinbaus der Harnblase. Von luminal nach basal: Die Tunica mucosa besteht aus Urothel und Lamina propria. Im Urothel werden Deckzellen mit AUM (= asymmetrical unit membrane), Intermediärzellen und Basalzellen unterschieden, wobei letztere der Basalmembran aufsitzen. Die Tunica muscularis besteht aus innerer Längs-, mittlerer Ring- und äußerer Längsmuskelschicht, die Tunica serosa aus Mesothel.

und der Harnentleerung im Miktionsvorgang. Diese beiden Komponenten hängen von neuralen Schaltkreisen in Gehirn, Rückenmark und peripheren Ganglien ab und werden über vier verschiedene Nervenarten kontrolliert: parasympathische, sympathische, sensorische und somatische Nerven (Morrison et al. 2005). Der Parasympathikus ist für die Kontraktion des M. detrusor verantwortlich. Die präganglionären parasympathischen Fasern (Sakralsegment 3-4) werden im Plexus pelvici und in der Blasenwand über nAChR umgeschaltet (de Groat & Booth 1993). Die postganglionären Fasern innervieren die glatte Muskulatur der Harnblasenwand über mAChR (Andersson & Arner 2004). Die sympathischen

Fasern aus dem lumbalen Grenzstrang verlaufen über den Plexus hypogastricus und innervieren die glatte Muskulatur der Gefäße. Sakrale somatische Nerven gelangen über den N. pudendus an den M. sphincter vesicae externus (Kriz 2003, Morrison et al. 2005).

Aufbau, Struktur und Funktion des Urothels

Das Urothel wird auch nach heutiger Lehrmeinung nicht eindeutig als mehrschichtiges oder mehrreihiges Epithel beschrieben (Drenckhahn 2003a). In der vollständig kontrahierten Harnblase weist das Urothel sechs bis acht Kernreihen auf, die sich in gedehntem Zustand zu drei Kernreihen abflachen (Bloom & Fawcett 1975). In der Maus wird das Urothel als drei- bis vierlagig beschrieben (Romih et al. 2005) und es werden drei Zelltypen (Deckzellen, Intermediärzellen, Basalzellen, Abb. 1.9) unterschieden, die jeweils eine eigene Schicht bilden (Walker 1960). Die großen, flachen Deckzellen erstrecken sich oft über mehrere darunterliegende Zellen, sind meist mehrkernig und haben den DNA-Gehalt diploider, tetraploider und oktaploider Zellen (Farsund 1977), was auf Amitosen und Synzytien zurückgeführt wird. Die apikale Membran gleicht einer hexagonal gemusterten, starren Platte, bei der die äußerste Schicht deutlich dicker ist als die anderen (AUM = asymmetrical unit membrane, früher „Crusta“ genannt; Hicks 1965, Koss 1969). Die AUM dient außerdem in Form von spindelförmigen zytoplasmatischen Vesikeln als Membranreserve, die bei Bedarf (z. B. Dehnung) mittels Exozytose in die Zellmembran eingebaut werden können (Wu et al. 1990).

In der Maus wurde gezeigt, dass die Deckzellen das für sie spezifische Zytokeratin CK20 enthalten (Moll et al. 1992, Romih et al. 1998), das in Nähe der apikalen Membran zu einem komplexen Netzwerk organisiert ist (Romih et al. 1998, Veranic et al. 2004). Auch die vier Uroplakine Ia, Ib, II und III, die als Membranproteine in der AUM enthalten sind, konnten in den Deckzellen nachgewiesen werden (Wu et al. 1990, 1995, Romih et al. 2005). Die Intermediär- und Basalzellen sind kleinere, kubische Zellen. In den Intermediärzellen wurden ebenfalls alle vier Uroplakine nachgewiesen, während die Basalzellen keine Uroplakine besitzen (Romih et al.

2005). Die Regeneration des Urothels erfolgt über die basale Zellschicht und dauert etwa 24 Tage.

Das Urothel schützt durch die AUM und durch gut ausgebildete Zonulae occludentes das darunterliegende Gewebe vor den zellschädigenden Substanzen des Harns (Lewis 2000, Drenckhahn 2003a, Apodaca 2004) und stellt eine effektive Barriere zwischen Blut und Harn dar (Ketterer et al. 1973, Chang et al. 1994, Negrete et al. 1996). Lange Zeit hatte man dem Urothel nur diese passive Barrierefunktion zugeordnet. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass das Urothel Substanzen wie ACh (Wessler et al. 1998, Yoshida et al. 2004, 2006), ATP (Ferguson et al. 1997) und NO (Birder et al. 1998) freisetzen kann und eine Vielzahl von Rezeptoren wie cholinerge Rezeptoren (de Groat et al. 2004, Beckel et al. 2006), adrenerge Rezeptoren (Birder et al. 1998, 2001, 2002a), TRP (transient receptor potential) -Kanäle (Stein et al. 2004), Tachykinin- und Bradykininrezeptoren (Chopra et al. 2005) exprimiert. So wird das Urothel zu einem Gewebe, dass auf seine chemische und physikalische Umgebung reagieren und mit den benachbarten Nerven kommunizieren kann (de Groat 2006).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Zur Behandlung von Miktionsstörungen werden in der Klinik Anticholinergika intravesikal instilliert, was eine Wirkung auf cholinerge Rezeptoren des Urothels vermuten lässt. Interessanterweise konnte im Urothel der Harnblase von Mensch, Ratte und Maus Acetylcholin (ACh) gemessen werden. Daraus schließen wir, dass im Urothel, einem non-neuronalen Gewebe, nicht nur cholinerge Rezeptoren vorkommen, sondern ACh auch direkt gebildet, freigesetzt und über autokrine/parakrine Mechanismen auf cholinerge Rezeptoren wirken könnte. Hieraus leiten sich folgende Fragen ab:

1. Werden im Urothel der Harnblase nikotinische ACh-Rezeptoren (nAChR) exprimiert?

2. Welche Untereinheiten des nAChR (ligandenbindende α -Untereinheiten) kommen im Urothel vor?
3. Wo sind die im Urothel nachgewiesenen α -Untereinheiten lokalisiert?
4. Welche Proteine der ACh-Freisetzungsmaschinerie werden vom Urothel exprimiert?
5. Wo sind die im Urothel nachgewiesenen ACh-Freisetzungsmechanismen lokalisiert?

Diese Fragestellung wurde an der Maus als Versuchstier bearbeitet, da eine große Anzahl an Tieren ein aussagekräftiges Resultat ermöglicht und KO-Mäuse für einige Komponenten des cholinergen Systems bereits generiert wurden. Von den Ergebnissen dieser Arbeit wird erwartet, dass die molekularen Komponenten des urothelialen cholinergen Systems identifiziert werden und dadurch die Wirkungsweise intravesikal instillierter cholinergischer Substanzen verständlicher wird. Diese Grundlagen könnten dazu dienen, neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die cholinerge Neuroblastom-Zelllinie NS20Y, die eine hochspezifische ChAT exprimiert (Amano et al. 1972), diente für unsere Untersuchungen als typischer Vertreter einer cholinergen neuronalen Zelle.

2.1.1 Die Zelllinie NS20Y

Die Zelllinie NS20Y ist ein cholinerges Subklon der Neuroblastom-C1300-Zelllinie der Maus. Die Neuroblastomzellen wuchsen 1940 spontan und enthalten mehr Chromosomen als eine normale diploide Zelle der Maus (bei cholinergen Klonen zwischen 59 und 118 Chromosomen, Hauschka et al. 1956). Sie zeichnen sich durch eine schnelle in-vitro-Vermehrung aus und besitzen viele charakteristische Eigenschaften differenzierter Neurone. Die Zelllinie NS20Y (Nr. ACC 94, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) weist eine hochspezifische ChAT-Aktivität auf (Amano et al. 1972). Die Zellen haben eine runde Form und bilden Fortsätze aus, sie wachsen in einem Monolayer oder kleinen Haufen und haben eine Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden.

2.1.2 Wachstumsbedingungen und Lagerung

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm², Nunc, Wiesbaden), die zuvor mit 100% fetalem Kälberserum (FKS, Invitrogen, Karlsruhe) beschichtet wurden, in Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (D-MEM, PAA Laboratories, Cölbe) mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (PAA Laboratories) bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (Typ BB 16 Heraeus,

Hanau) kultiviert. Zur Passagierung der Zellen wurden diese mit Accutase (PAA Laboratories) vom Boden gelöst und auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt.

Zur Lagerung überschüssiger Zellen wurden diese mit Accutase vom Boden gelöst, abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min) und in D-MEM mit 10% Dimethylsulfoxid (Serva, Heidelberg) langsam (1°C pro Minute) im Alkoholkühler (Isopropanol, Nalgene, Neerijse, Belgien) auf -80°C abgekühlt. Bei erneuter Verwendung konnten die Zellen aufgetaut und angezüchtet werden.

2.1.3 Verwendung

Zur RNA-Isolierung (n=5) aus der Zelllinie NS20Y wurden aus wachsender Kultur Zellen der 4.-14. Passage mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden für jede RNA-Gewinnung ca. 1,5 Mio. Zellen verwendet. Zur immunhistochemischen Untersuchung (n=4) der Zelllinie NS20Y wurden aus wachsender Kultur Zellen der 4.-14. Passage mittels Neubauer-Zählkammer gezählt, nach entsprechender Verdünnung je 20.000 Zellen pro Napf auf einem Objektträger mit 8-Kammer-Aufsatz (Culture Slides, beschichtet mit Poly-D-Lysin, Becton Dickinson Labware, Heidelberg) ausgesät und 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

2.2 Gewebegewinnung

2.2.1 Tiere und entnommene Gewebe

Für die Versuche wurden sowohl erwachsene männliche und weibliche FVB-Mäuse aus der Zucht des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen als auch adulte männliche und weibliche CS57 Bl6-Mäuse (Züchter: Harlan-Winkelmann, Borcheln) verwendet. Für die Untersuchungen an OCT1 stand eine OCT1/2-Doppelknockout-Maus (Jonker et al. 2003, The Netherlands Cancer Institute, Division of Experimental Therapy, Amsterdam, Niederlande) und ihr korrespondierender Wildtypstamm (FVB) zur Verfügung. Die Mäuse wurden vor der Gewebeentnahme mittels Inhalation einer Überdosis Isofluran (Abbott, Wiesbaden) getötet.

Für die PCR-Versuche wurden als Positivkontrolle Rückenmark, Aorta und Niere entnommen (n=3 Tiere, FVB), von der Harnblase wurde das Urothel (n=5 Tiere, FVB, CS57 Bl6) wie unten beschrieben verwendet. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden als Positivkontrolle Spinalganglien, Aorta, Trachea, Zunge, Niere und Haut (n=1 Tier, FVB) entnommen, die Harnblase als gesamtes Organ (n=5 Tiere, FVB, CS57 Bl6) wurde wie unten beschrieben verwendet.

2.2.2 Gewinnung von unfixiertem Gewebe

Für die RNA-Gewinnung wurde das Gewebe entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für immunhistochemische Untersuchungen wurde das entnommene Gewebe in Tissue Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, in schmelzendem Isopentan schockgefroren und anschließend längstens einen Monat bei -80°C gelagert.

2.2.3 Immersionsfixierung

Außer dem schockgefrorenen Gewebe wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen auch immersionsfixierte Gewebe verwendet. Diese wurden nach Entnahme zwei Stunden lang in gepuffertem 4% Paraformaldehyd (PFA, 40 g Formaldehyd (Riedel-de-Haen, Seelze) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 (PP)) fixiert und anschließend vier Stunden lang mit 0,1 M PP, pH 7,4, gewaschen. Zum Gefrierschutz wurde das Gewebe über Nacht in 18% Saccharose in 0,1 M PP, pH 7,4, gelegt und dann in Tissue Tek eingebettet, in schmelzendem Isopentan schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.4 Besondere Präparationsverfahren an der Harnblase

Zur RNA-Gewinnung aus dem Urothel wurde die Harnblase herauspräpariert, der Länge nach aufgeschnitten und auf Zahnwachs aufgespannt. Dann wurde mit einem Spatel das Urothel abgeschabt, in 50 µl Lysis-Puffer (RNeasy mini Kit, Qiagen, Hilden, s.u.) gelöst und zur weiteren Verwendung bei -80°C zwischengelagert.

Die restliche Harnblase wurde in ihrer gesamten Länge geschnitten und davon jeder zehnte Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Unter dem Lichtmikroskop konnte so kontrolliert werden, dass nur das Urothel abgeschabt wurde. Für immunhistochemische Untersuchungen wurde die Harnblase zum Gefrierschutz und zur besseren Beurteilung des Urothels mittels einer Kanüle mit 50% Tissue Tek in 0,005 M PP, pH 7,4, mit 4,48 g/l NaCl (PBS) gefüllt.

2.3 Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

2.3.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde aus Mausgewebe mittels des RNeasy mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden Gewebestücke von 30 mg in 600 μ l Lysis-Puffer (Puffer RLT mit 1% β -Mercaptoethanol (14,3 M, Serva)) in der Kugelmühle (Retsch, Haan) zerkleinert. Das Gewebelysat wurde bei 14.000 rpm abzentrifugiert und dem Überstand 600 μ l 70% Ethanol (Riedel-de-Haen) zugesetzt. Mittels Zentrifugation (15 s, 10.000 rpm) wurde die Gesamt-RNA an die Membran der RNeasy mini Säule gebunden, dann mit 700 μ l Puffer RW1 und zweimal mit 500 μ l Puffer RPE (zuvor mit vierfachem Volumen Ethanol versetzt) gewaschen. Nach Trocknen der Säule (2 min, 10.000 rpm) wurde die RNA mit 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert (1 min, 10.000 rpm). Der RNA-Gehalt wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C höchstens drei Monate gelagert.

Die Gesamt-RNA wurde aus der Neuroblastomzelllinie NS20Y ebenso mittels des RNeasy mini Kit isoliert. Dazu wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen, in 600 μ l Lysis-Puffer (Puffer RLT mit 1% β -Mercaptoethanol) gelöst und mit Hilfe der QIAshredder spin Säule homogenisiert. Der Durchfluss wurde auf eine RNeasy mini Säule gegeben und die RNA wurde entsprechend des oben beschriebenen Protokolls weiter aufgereinigt.

Messenger-RNA (mRNA) -Isolierung

Die mRNA wurde aus der Neuroblastomzelllinie NS20Y mit Hilfe des Oligotex Direct mRNA mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 600 μ l Lysis-Puffer (Puffer OL1 mit 3% β -Mercaptoethanol) gelöst. Das Zelllysats wurde nach Zusatz von 1,2 ml Puffer ODB abzentrifugiert (3 min, 14.000 rpm) und der Überstand mit 20 μ l Oligotex Suspension 10 min inkubiert. Nach Ausfällen eines Pellets (5 min, 14.000 rpm) wurde dieses in 350 μ l Puffer OW1 resuspendiert. Mittels Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) wurde die mRNA an die Membran der Säule gebunden und zweimal mit Puffer OW2 gewaschen. Die mRNA wurde mit 30 μ l Puffer OEB eluiert (1 min, 14.000 rpm). Der RNA-Gehalt wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C höchstens drei Monate gelagert.

cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Zur cDNA-Synthese wurden zwischen 4 und 5 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. DNA-Verunreinigungen wurden im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal, Hamburg) durch Inkubation mit 1 μ l DNase I (1 U/ μ l, Invitrogen) und 1 μ l 10x DNase-Puffer (Invitrogen) für 15 min bei 25°C abgebaut. Der DNA-Verdau wurde durch Zugabe von 1 μ l Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA, 25 mM, Invitrogen) bei 65°C für 10 min gestoppt. Die Gesamt-RNA wurde mittels 1 μ l Superscript II H⁻ Reverse Transkriptase (200 U/ μ l, Invitrogen) unter Zugabe von 1 μ l Oligo (dT)₁₈ (0,5 μ g/ml, MWG Biotech, Ebersberg), 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP bei pH 7,0, Perkin Elmer, Wellesley, USA), 4 μ l 5x First Strand Puffer (Invitrogen) und 2 μ l 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Invitrogen) für 50 min bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min gestoppt. Das Reaktionsprodukt wurde bei -20°C gelagert.

cDNA-Synthese aus mRNA

Für die cDNA-Synthese aus mRNA wurden zwischen 0,3 und 0,6 μg mRNA eingesetzt. Die mRNA wurde im Thermocycler mittels 1 μl Superscript II H⁻ Reverse Transkriptase durch Zugabe von 1 μl Oligo (dT)₁₈, 1 μl dNTP-Mix, 4 μl 5x First Strand Puffer, 2 μl 0,1 M DTT und 1 μl RNase-freies Wasser für 50 min bei 42 °C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min gestoppt. Das Reaktionsprodukt wurde bei -20°C gelagert.

2.3.2 Durchführung der RT-PCR

Zur Amplifikation bekannter DNA-Abschnitte wurde ein Master-Mix hergestellt, der aus 2 μl MgCl₂-Puffer (25 mM, Applied Biosystems, Weiterstadt), 2,5 μl 10x PCR-Puffer II (Applied Biosystems), 0,625 μl dNTP-Mix, 0,125 μl Taq DNA-Polymerase (Ampli Taq Gold 5 U/ μl , Applied Biosystems) und 17,5 μl RNase-freiem Wasser bestand. Zum Master-Mix wurden 1 μl cDNA und je 0,625 μl forward und reverse Primer (200 pmol/ μl , MWG Biotech) zugegeben. Im Thermocycler wurde der DNA-Doppelstrang bei 94°C für 12 min denaturiert. Dann wurden 40 Zyklen folgenden Ablaufs durchgeführt: Die neu entstandenen DNA-Doppelstränge wurden bei 94°C für 45 s denaturiert. Bei einer Annealing-Temperatur zwischen 56°C und 63°C für 45 s hybridisierten die Primer mit den komplementären DNA-Abschnitten. Bei 73°C für 45 s polymerisierte die Taq DNA-Polymerase zwischen den beiden Primern den neuen DNA-Abschnitt. Zuletzt wurde die DNA bei 73°C für 7 min zu Ende repliziert und das Reaktionsprodukt anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

Die verwendeten Primer (Tabelle 2.1) waren RNA-Oligonukleotide von ca. 20 bp Länge, die an spezifischer Stelle komplementär an die DNA binden. Von der Bindungsstelle aus konnte die Taq DNA-Polymerase die Synthese des neuen DNA-Strangs beginnen. Die Primer wurden, basierend auf den in der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) veröffentlichten Gensequenzen, im Internet mittels Primersuchprogramm (frodo.wi.mid.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) herausgesucht und

mit dem BLAST-Computerprogramm (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) auf Spezifität geprüft. Die Primer wurden von MWG Biotech synthetisiert. Um den Erfolg der RNA-Isolation und cDNA-Synthese nachzuweisen, wurde ein Primer für ein ubiquitär vorkommendes Enzym, die Glyceral-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) eingesetzt, als Negativkontrolle wurde in jeweils einer Probe die cDNA durch Wasser ersetzt.

2.3.3 Auswertung der RT-PCR-Produkte

Größe und Reinheit der RT-PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Ein 1,5%iges Agarosegel wurde aus 1,5 g Agarose (Inno-train Diagnostik, Kronberg/Taunus) und 1 μ l Ethidiumbromid (1%ig, Carl Roth, Karlsruhe) in 100 ml TAE-Puffer (1x, für 50x: 242 g Tris Base (Merck, Darmstadt), 57,1 ml Essigsäure und 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0, Carl Roth)) hergestellt. Bei Anlegen einer elektrischen Spannung von 125 mV wurden die DNA-Fragmente im Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies konnte durch einen Ladepuffer, bestehend aus 1% Orange-G (Sigma, Taufkirchen) in 50% Glycerol-Wasser-Gemisch mit je 50 mM Tris-HCl und EDTA, pH 8,0 verfolgt werden, mit dem die Proben versetzt wurden. Die entstandenen DNA-Banden konnten durch Ethidiumbromid-Markierung der DNA unter UV-Licht ausgewertet werden. Die Überprüfung der korrekten Produktgröße erfolgte durch Vergleich der Höhe der einzelnen Banden mit einem standardisierten Marker (100 bp DNA-Ladder, Gibco BRL, Karlsruhe).

2.3.4 Aufreinigung des RT-PCR-Produktes zur Sequenzierung

Das RT-PCR-Produkt wurde mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Aus einem 2%igem Elektrophoresegel wurde das PCR-Produkt ausgeschnitten und in Puffer QG bei 50°C vollständig gelöst. Die Lösung wurde mit 100%igem Isopropanol (Riedel-de-Haen) versetzt, die DNA an eine Säule gebunden und mit 500 μ l Puffer QG und 750 μ l Puffer PE gewaschen. Nach Trocknen der Säulenmembran wurde die DNA mit 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Der DNA-Gehalt wurde bei einer Wellenlänge von

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Verwendete Primer.

Primer		Sequenz (5'-3')	Produkt- länge	Annealing- temperatur	Genbank- Zugangs- nummer
VACHT	for	GTATCCCGAGGAGCCTGAG	571 bp	60°C	NM.021712
Maus	rev	CTGTGTCCACTAACGCGATG	(1035-2056)		
Mediatophor	for	TATTCTTCGTTTTTCGGTGTCA	223 bp	56°C	NM.009729
Maus	rev	TGCCATCAGTCAGGGAGTT	(175-398)		
OCT 1	for	GTAAGCTCTGCCTCCTGGTG	186 bp	63°C	NM.009202
Maus	rev	GCTGTCGTTCTCCTGTAGCC	(706-892)		
OCT 2	for	TACCGGAGTCTCCAAGATGG	169 bp	59°C	NM.013667
Maus	rev	GACCAAGTCCAGGAACGAAG	(940-1109)		
OCT 3	for	CAGATATGGCAGGCTCATCA	160 bp	57,5°C	NM.011395
Maus	rev	TCACGATCACGAAGCAAGTC	(896-1056)		
nAChR $\alpha 2$	for	CTCCCATCCTGCTTTCCAG	115 bp	59°C	NM.144803
Maus	rev	GTTTGAACAGGCGGTCCTC	(125-240)		
nAChR $\alpha 3$	for	GCGAACAGGTCACAGTTTATG	104 bp	59°C	AF472588
Maus	rev	GCATTTTCTCTGGGTTTTCA	(1479-1583)		
nAChR $\alpha 4$	for	TGCAAGGAACCATCTCCTGT	132 bp	59°C	NM.015730
Maus	rev	GGTGGTCTGCAATGTACTGG	(1618-1750)		
nAChR $\alpha 5$	for	CGCTCTTCTTCCACACACAA	141 bp	59°C	AF204689
Maus	rev	TAGGTCCACCGTCTTTCTCG	(913-1054)		
nAChR $\alpha 6$	for	CTTTGTCACGCTGTCCAT	158 bp	59°C	NM.021369
Maus	rev	GCCTCCTTTGTCTTGTCC	(1016-1174)		
nAChR $\alpha 7$	for	ACAGTACTTCGCCAGCACCA	144 bp	60°C	AF225980
Maus	rev	AAACCATGCACACCAATTCA	(922-1066)		
nAChR $\alpha 9$	for	ACAAGGCCACCAACTCCA	152 bp	59°C	XM132045
Maus	rev	ACCAACCCACTCCTCCTCTT	(1637-1789)		
nAChR $\alpha 10$	for	TCTGACCTCACAACCCACAA	168 bp	60°C	AF196344
Ratte	rev	TCCTGTCTCAGCCTCCATGT	(1561-1729)		
GAPDH	for	CGTCTTCAACCATGGAGA	299 bp	60°C	AF106860
	rev	CGGCCATCACGCCACAGCTT	(1143-1442)		

260 nm photometrisch bestimmt. Die aufgereinigte DNA wurde in einem 1,5%igen Elektrophoresegel überprüft und bei MWG Biotech ansequenziert.

2.4 Immunhistochemische Verfahren

2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Indirekte Immunfluoreszenz an den NS20Y-Zellen

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Neuroblastomzelllinie NS20Y wurden die auf einem Objektträger wachsenden Zellen für 20 Minuten mit dem jeweiligen Fixativ (Aceton bei -20°C, Isopropanol bei 4°C) fixiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Blockung unspezifischer Bindungen mit 50% normalem Schweineserum (NSS, hitzeinaktiviert und sterilfiltriert, Schlachthof Marburg) in PBS für eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper in PBS + 4,48 g/l NaCl (PBS+S) über Nacht inkubiert (Verdünnung: Tabelle 2.2). Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen eine Stunde mit dem Sekundärantikörper in PBS+S inkubiert (Verdünnung: Tabelle 2.3), erneut gewaschen und mit carbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt. Zur besseren Auswertung wurde eine Kernfärbung mit 4,6-Diamin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI, 1 µg/ml, Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die Objektträger wurden bei 4°C dunkel gelagert. Die Immunreaktion wurde im Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss, Jena) und im konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM, TCS SP2, Leica, Mannheim) ausgewertet und dokumentiert.

Indirekte Immunfluoreszenz an verschiedenen Geweben zur Positivkontrolle

Zur Positivkontrolle der Antikörper wurden von verschiedenen Mausgeweben (Tabelle 2.4) Gefrierschnitte von 10 µm Dicke angefertigt (Kryostat CM 1900, Leica) und diese auf Objektträger SuperFrost Plus (R. Langenbrinck, Teningen) aufgezogen. Nach Fixierung für 20 Minuten mit dem jeweiligen Fixativ (Aceton bei -20°C, Isopropanol bei 4°C, Zamboni-Fixativ: 2% Formaldehyd, 15% Pikrinsäure in 0,1 M

PP, pH 7,0, bei 4°C, 4% PFA bei Raumtemperatur) wurden die Objektträger für eine Stunde getrocknet. Dann erfolgte die Blockung unspezifischer Bindungen bei den mit Aceton oder Isopropanol behandelten Schnitten mit 50% NSS und bei den mit PFA oder Zamboni fixierten Schnitten mit 10% NSS und 0,5% Tween in PBS für eine Stunde. Anschließend wurden die Gewebe mit den primären Antikörpern in PBS+S über Nacht inkubiert (Verdünnung: Tabelle 2.2). Nach Waschen mit PBS wurden die Gewebe eine Stunde mit den Sekundärantikörpern in PBS+S inkubiert (Verdünnung: Tabelle 2.3), erneut gewaschen und mit carbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt. Die Objektträger wurden bei 4°C dunkel gelagert. Die Immunreaktion wurde im Fluoreszenzmikroskop und im CLSM ausgewertet und dokumentiert.

Indirekte Immunfluoreszenz an der Harnblase

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Harnblase wurden Gefrierschnitte von 10 μm Dicke angefertigt und diese auf Objektträger aufgezogen. Natives Gewebe wurde für 20 Minuten in das jeweilige Fixativ (Aceton bei -20°C, Isopropanol bei 4°C, Zamboni-Fixativ bei 4°C) gedippt. Sowohl das gedippte als auch das in 4% PFA immersionsfixierte Gewebe wurde eine Stunde lang getrocknet. Die Blockung unspezifischer Bindungen erfolgte für eine Stunde bei den mit Aceton oder Isopropanol behandelten Geweben mit 50% normalem Pferdeserum (NPS, hitzeinaktiviert und sterilfiltriert, Schlachthof Marburg) und bei den mit PFA oder Zamboni fixierten Geweben mit 10% NPS und 0,5% Tween in PBS. Anschließend wurden die Gewebe mit den primären Antikörpern in PBS+S über Nacht inkubiert (Verdünnung: Tabelle 2.2). Nach Waschen mit PBS wurden das Gewebe eine Stunde mit dem Sekundärantikörper in PBS+S inkubiert (Verdünnung: Tabelle 2.3), erneut gewaschen, für zehn Minuten in 4% PFA nachfixiert, gewaschen und mit carbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt. Die Objektträger wurden bei 4°C dunkel gelagert. Die Immunreaktion wurde im Fluoreszenzmikroskop und im CLSM ausgewertet und dokumentiert.

Tabelle 2.2: Primärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenz. Der Antikörper zum Nachweis von OCT1 ist gegen eine AS-Sequenz nahe des zytoplasmatisch gelegenen C-terminalen Endes von rOCT1, das zu 95% identisch mit mOCT1 ist, gerichtet. Der Antikörper zum Nachweis von OCT2 ist gegen eine AS-Sequenz in der großen intrazellulären Schleife von rOCT2 gerichtet. Der Antikörper zum Nachweis von OCT3 ist gegen eine AS-Sequenz in der großen intrazellulären Schleife von rOCT3 gerichtet. IT = Immunisierungstag.

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Quelle
VACHT (AS 526-539, Ratte)	Ziege, polyklonal	1:800	Biotrend, Köln
OCT 1 (affinitätsgereinigt, 21 AS, Ratte)	Kaninchen, polyklonal	1:20	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
OCT 2 (affinitätsgereinigt, 21 AS, Ratte)	Kaninchen, polyklonal	1:400	Alpha Diagnostic
OCT 3 (affinitätsgereinigt, 18 AS, Ratte)	Kaninchen, polyklonal	1:75-1:400	Alpha Diagnostic
α 3-Untereinheit (AS 496-503)	Kaninchen, polyklonal	1:800	DPC Biermann, Bad Nauheim
α 4-Untereinheit (AS 568-588, Ratte)	Meerschweinchen, polyklonal	1:400-1:1500	Chemicon, Hofheim
α 5-Untereinheit (AS 460-468)	Kaninchen, polyklonal	1:1600	DPC Biermann
α 7-Untereinheit (AS 493-502)	Kaninchen, polyklonal	1:800	DPC Biermann
α 9-Untereinheit (AS 65-81 und 99-112)	Kaninchen polyklonal	1:300-1:400	Nguyen et al. 2000
α 10-Untereinheit (AS 404-417)	Kaninchen (Tier 1, 61. IT), polyklonal	1:2000	Lips et al. 2002
α 10-Untereinheit	Meerschweinchen (115.	1:2000	Lips et al. 2002

2 Material und Methoden

(AS 404-417)	IT), polyklonal		
α 10-Untereinheit (AS 404-417)	Kaninchen (Tier 2, 80. IT), polyklonal	1:1500	Lips et al. 2002

Tabelle 2.3: Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenz. FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Ziege-IgG	Maus	FITC	1:200	Dianova, Hamburg
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	1:2000	Dianova
Meerschweinchen-IgG	Esel	FITC	1:100	Dianova

Tabelle 2.4: Kontrollgewebe und verwendete Fixative.

Antigen	Gewebe	Fixativ
VACHT	Zunge	Aceton oder PFA
OCT 1	Trachea	Aceton oder PFA
OCT 2	Niere	Aceton
OCT 3	Trachea	Aceton
α 3-Untereinheit	Spinalganglion	Aceton
α 4-Untereinheit	Spinalganglion	Aceton
α 5-Untereinheit	Spinalganglion	Aceton
α 7-Untereinheit	Spinalganglion	Aceton
α 9-Untereinheit	Haut	Isopropanol
α 10-Untereinheit (Kaninchen Tier 1)	–	Zamboni
α 10-Untereinheit (Meerschweinchen)	–	Aceton
α 10-Untereinheit (Kaninchen Tier 2)	Aorta	Aceton

2.4.2 Kontrolle der indirekten Immunfluoreszenz

Negativkontrolle

In jeder indirekten Immunfluoreszenz wurde eine Kontrolle ohne Primärantikörper mitgeführt. Nur wenn diese keine Immunmarkierung zeigte, wurde die Immunfluoreszenz ausgewertet.

Präabsorption

Zur Bestimmung der Spezifität der Primärantikörper wurde das korrespondierende Peptid (Tabelle 2.5) in einer Konzentration von 200-400 $\mu\text{l/ml}$ mit dem jeweiligen Antikörper in PBS+S eine Stunde inkubiert und anschließend in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die mitgeführte Immunfluoreszenz ohne Peptid. Nur Markierungen, die nicht in der Präabsorptionskontrolle erschienen, waren spezifisch.

Kontrolle mittels Knockout-Maus

Zur Bestimmung der Spezifität des OCT1-Primärantikörpers wurde eine OCT1/2-Doppel-KO-Maus (Jonker et al. 2003, The Netherlands Cancer Institute, Division of Experimental Therapy, Amsterdam, Niederlande) in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde der korrespondierende Wildtypstamm (FVB) mitgeführt. Nur Markierungen, die nicht in der Immunfluoreszenz der KO-Maus erschienen, waren spezifisch.

Tabelle 2.5: Präabsorptionspeptide.

Peptid	Sequenz	Konzentration	Quelle
VACHT	NH ₂ -Phe-Asp-Gly-Cys-Glu-Asp-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Tyr-Ser-Arg-Ser-COOH	400 µg/ml	Biotrend
OCT 1	21 AS	400 µl/ml	Alpha Diagnostic
OCT 2	21 AS	400 µl/ml	Alpha Diagnostic
OCT 3	18 AS	200 µl/ml	Alpha Diagnostic
α3-Untereinheit	NH ₂ -Cys-Pro-Leu-Met-Ala-Arg-Glu-Asp-Ala-COOH	400 µl/ml	DPC Biermann
α5-Untereinheit	NH ₂ -Cys-Pro-Val-His-Ile-Gly-Asn-Ala-Asn-Lys-COOH	400 µl/ml	DPC Biermann
α7-Untereinheit	NH ₂ -Cys-Phe-Val-Glu-Ala-Val-Ser-Lys-Asp-Phe-Ala-COOH	400 µl/ml	DPC Biermann
α10-Untereinheit	NH ₂ -Arg-Ser-His-Arg-Ala-Ala-Gln-Arg-Arg-His-Glu-Asp-Trp-Lys-Arg-CONH ₂	400 µl/ml	Pineda

3 Ergebnisse

3.1 Expression der molekularen Komponenten des cholinergen Systems im Urothel und in NS20Y-Zellen

3.1.1 Freisetzungsmechanismen von Acetylcholin

VACHT

Mittels RT-PCR wurde im abradierten Urothel (n=5) keine VACHT-mRNA nachgewiesen (Abb. 3.1). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) eine einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 571 bp nachgewiesen (Abb. 3.2). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde VACHT-mRNA als saubere Bande in der Größe von 571 bp nachgewiesen (Abb. 3.3). Mittels Sequenzierung (MWG Biotech) wurde gezeigt, dass das PCR-Produkt identisch zu der Gensequenz ist, die in der Genbank unter der Zugangsnummer NM_021712 niedergelegt wurde. Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

Mediatophor

Im abradierten Urothel (n=5) wurde Mediatophor-mRNA als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 223 bp nachgewiesen (Abb. 3.1). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.2). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso Mediatophor-mRNA nachgewiesen (Abb. 3.3). Mittels Sequenzierung (MWG Biotech) wurde gezeigt, dass das PCR-Produkt identisch zu der Gensequenz ist, die in der Genbank unter der Zugangsnummer NM_009729 niedergelegt wurde. Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

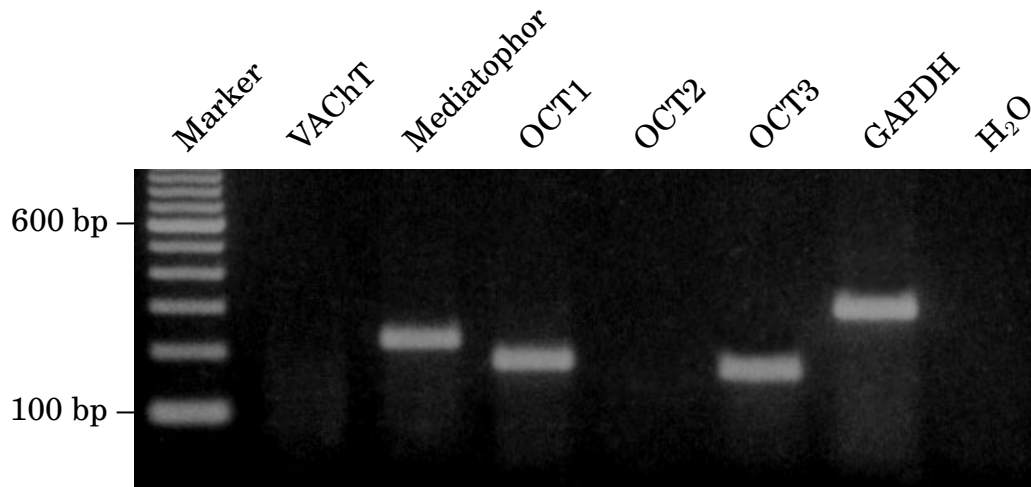


Abb. 3.1: Urothel: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Komponenten der ACh-Freisetzung. GAPDH = Positivkontrolle, H₂O = Negativkontrolle ohne cDNA.

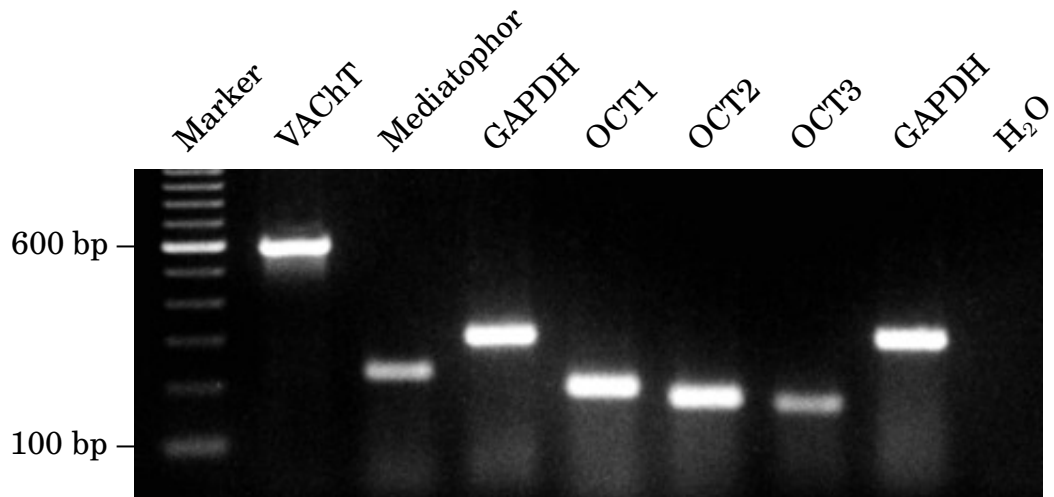


Abb. 3.2: Rückenmark, Niere: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Komponenten der ACh-Freisetzung im Rückenmark (VACHT, Mediatophor, GAPDH) und in der Niere (OCT1, OCT2, OCT3, GAPDH). GAPDH = Positivkontrolle, H₂O = Negativkontrolle ohne cDNA.

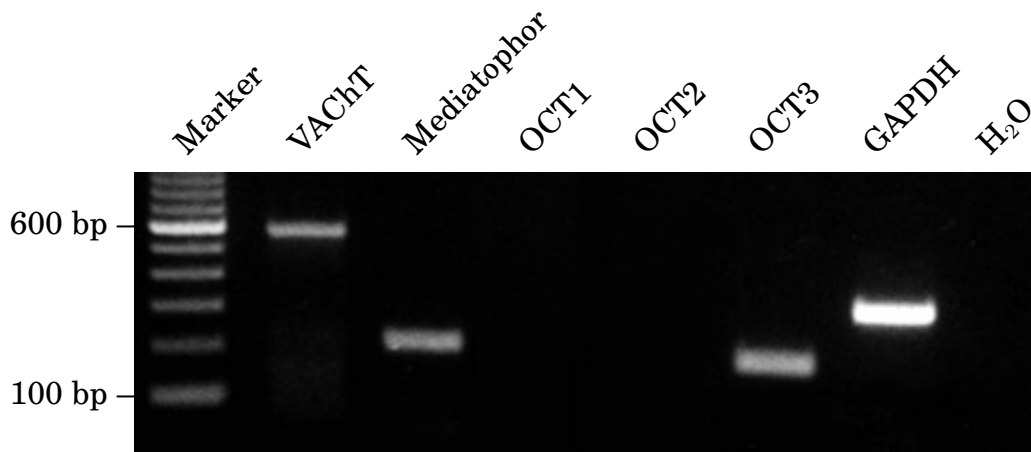


Abb. 3.3: NS20Y-Zellen: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Komponenten der ACh-Freisetzung. GAPDH = Positivkontrolle, H₂O = Negativkontrolle ohne cDNA.

OCT1

Im abradierten Urothel (n=5) wurde OCT1-mRNA als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 186 bp nachgewiesen (Abb. 3.1). Als Positivkontrolle wurde in der Niere (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.2). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde dagegen keine OCT1-mRNA nachgewiesen (Abb. 3.3). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

OCT2

Im abradierten Urothel (n=5) wurde keine OCT2-mRNA nachgewiesen (Abb. 3.1). Als Positivkontrolle wurde in der Niere (n=3) eine einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 169 bp nachgewiesen (Abb. 3.2). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso keine OCT2-mRNA nachgewiesen (Abb. 3.3). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

OCT3

Im abradierten Urothel (n=6) wurde OCT3-mRNA in drei von sechs Fällen als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 160 bp nachgewiesen (Abb. 3.1). Als

Positivkontrolle wurde in der Niere (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.2). Ebenso wurde in NS20Y-Zellen (n=5) OCT3-mRNA nachgewiesen (Abb. 3.3). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

3.1.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

α 2-Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde mRNA der α 2-Untereinheit als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 115 bp nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde dagegen keine mRNA der α 2-Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

α 3-Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde keine mRNA der α 3-Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) eine einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 104 bp nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde mRNA der α 3-Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

α 4-Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde mRNA der α 4-Untereinheit als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 132 bp nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso mRNA der α 4-Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

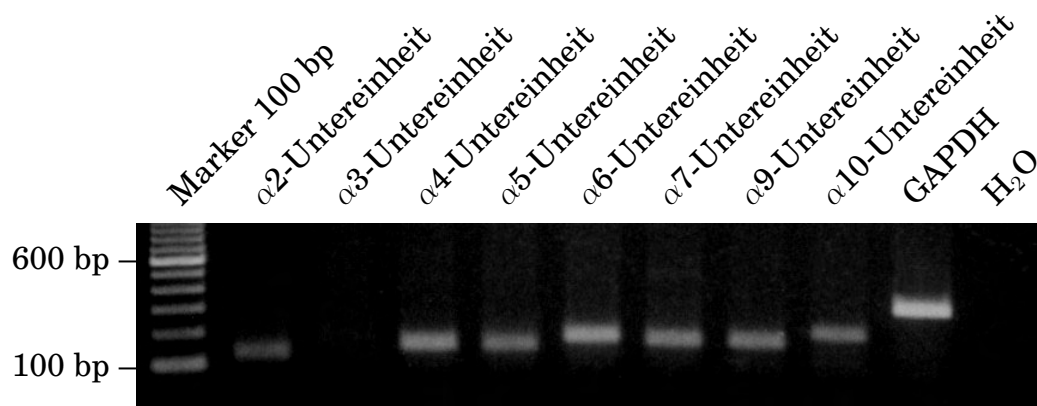


Abb. 3.4: Urothel: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis der Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors. GAPDH = Positivkontrolle, H₂O = Negativkontrolle ohne cDNA.

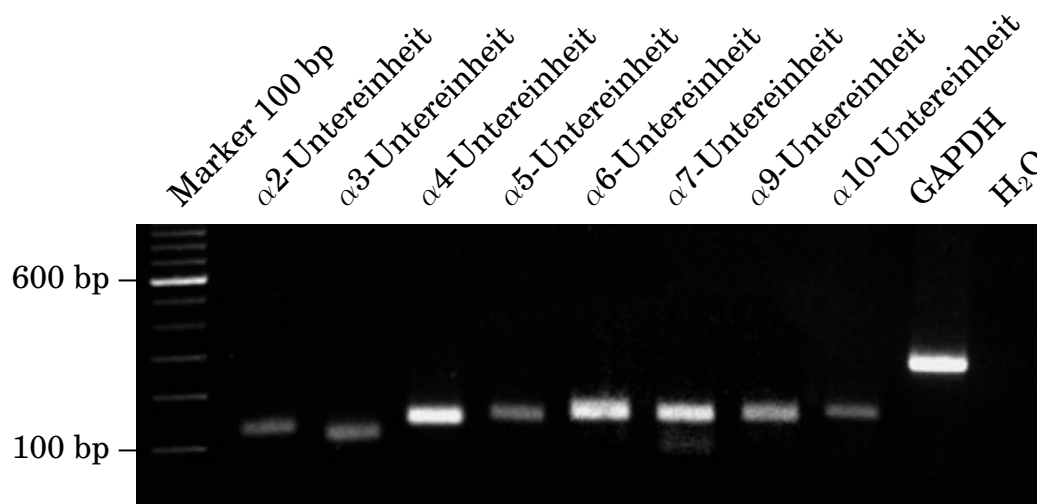


Abb. 3.5: Rückenmark: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis der Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors. GAPDH = Positivkontrolle, H₂O = Negativkontrolle ohne cDNA.

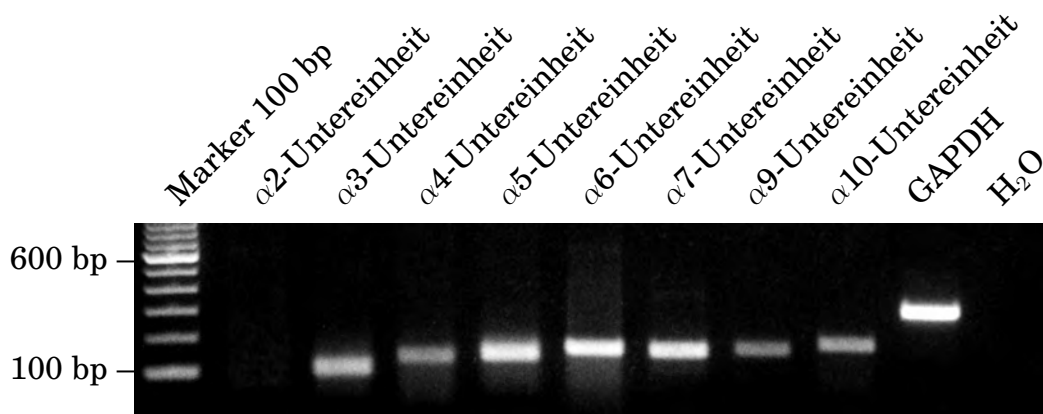


Abb. 3.6: NS20Y-Zellen: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis der Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors. GAPDH = Positivkontrolle, H₂O = Negativkontrolle ohne cDNA.

$\alpha 5$ -Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde mRNA der $\alpha 5$ -Untereinheit als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 141 bp nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso $\alpha 5$ -mRNA nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

$\alpha 6$ -Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde mRNA der $\alpha 6$ -Untereinheit als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 158 bp nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso mRNA der $\alpha 6$ -Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

$\alpha 7$ -Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde mRNA der $\alpha 7$ -Untereinheit als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 144 bp nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Posi-

tivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso mRNA der $\alpha 7$ -Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

$\alpha 9$ -Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde mRNA der $\alpha 9$ -Untereinheit als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 152 bp nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso mRNA der $\alpha 9$ -Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

$\alpha 10$ -Untereinheit

Im abradierten Urothel (n=5) wurde mRNA der $\alpha 10$ -Untereinheit als einzelne, saubere Bande in erwarteter Größe von 168 bp nachgewiesen (Abb. 3.4). Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark (n=3) ein Produkt gleicher Größe nachgewiesen (Abb. 3.5). In NS20Y-Zellen (n=5) wurde ebenso mRNA der $\alpha 10$ -Untereinheit nachgewiesen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt.

3.2 Lokalisation der molekularen Komponenten des cholinergen Systems im Urothel und in NS20Y-Zellen

3.2.1 Freisetzungsmechanismen von Acetylcholin

VACHT

Im Urothel (n=5) wurde keine VACHT-Immunreaktivität beobachtet. In Lamina propria und Tunica muscularis der Harnblase (n=5) wurden VACHT-immunreaktive Nervenfasern nachgewiesen. Die Spezifität dieser Markierung wurde mittels

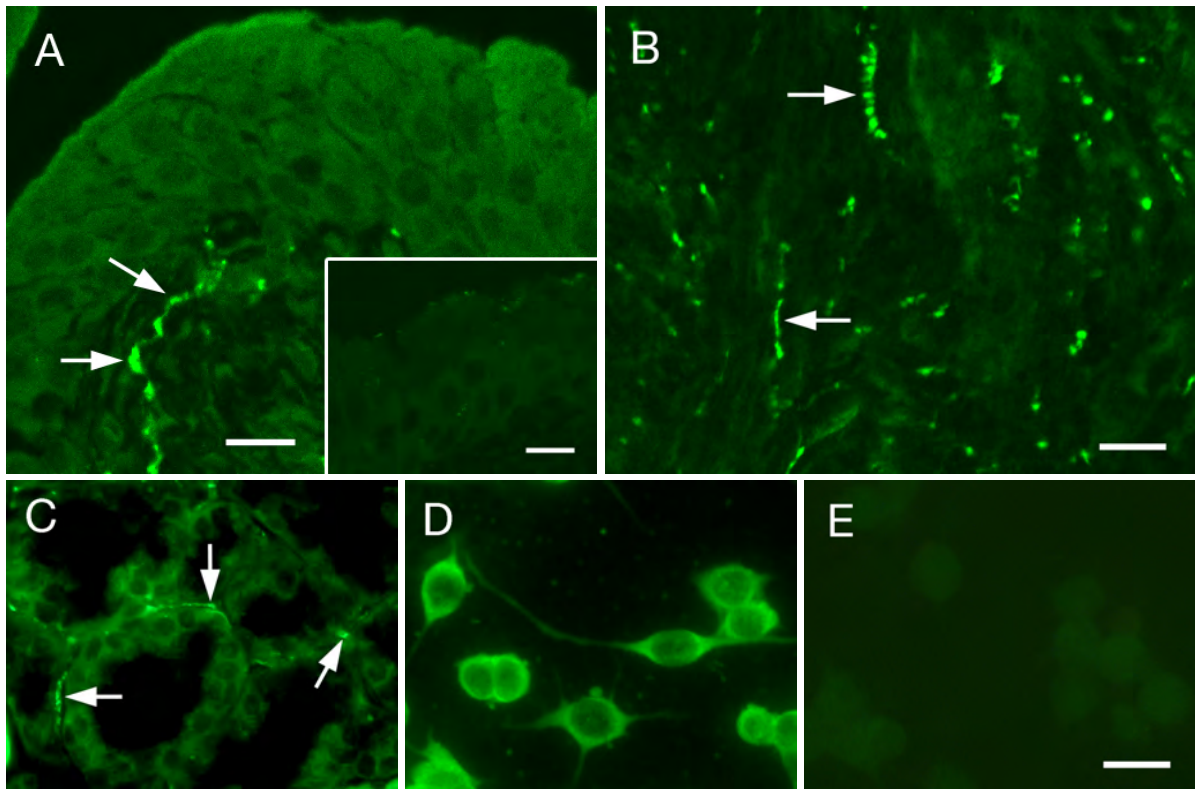


Abb. 3.7: VChAT-Immunreaktivität. Im Urothel und den Myozyten der Tunica muscularis wird keine Immunmarkierung gefunden, während Nervenfasern (Pfeile) in (A) Lamina propria und (B) Muskulatur immunpositiv sind. Inset in A: Präabsorptionskontrolle von A (CLSM-Aufnahmen). (C) An den Glandulae linguales sind Nervenfasern (Pfeile) immunpositiv. (D) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. (E) Präabsorptionskontrolle von D. Maßstab = 50 μm .

Präabsorptionskontrolle überprüft. (Abb. 3.7, A, B).

Als Positivkontrolle wurden im Zungengrund der Maus (n=1) VChAT-immunpositive Nervenfasern nachgewiesen (Abb. 3.7, C). In den NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine VChAT-Immunreaktivität mit starker Intensität dargestellt. Mittels Präabsorptionskontrolle wurde die Spezifität dieser Markierung nachgewiesen (Abb. 3.7, D, E).

OCT1

Im Urothel (n=5) wurde OCT1-Immunreaktivität vor allem in der Membran der Basal- und Intermediärzellen und in der apikalen Membran der Deckzellen nachgewiesen. Die basale Membran der Basalzellen ist stellenweise nur schwach markiert. Die Spezifität der Markierung wurde mittels Präabsorptionskontrolle überprüft. In Lamina propria und Tunica muscularis der Harnblase (n=5) wurde keine Immunmarkierung dargestellt. (Abb. 3.8, A, B). Zur zusätzlichen Kontrolle wurde in der Harnblase einer OCT1/2-Knockout-Maus (n=1) keine OCT1-Immunreaktivität nachgewiesen (Abb. 3.8, C).

Als Positivkontrolle wurde im Trachealepithel der Maus (n=1) OCT1-Immunmarkierung in der apikalen Membran der kinozilientragenden Zellen nachgewiesen (Abb. 3.8, D). In den NS20Y-Zellen (n=4) konnte keine spezifische OCT1-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.8, E, F).

OCT2

In der Harnblase (n=5) wurde keine spezifische OCT2-Immunreaktion beobachtet (Abb. 3.9, A).

Als Positivkontrolle wurde in der Niere der Maus (n=1) OCT2-Immunmarkierung in den Tubuluszellen nachgewiesen (Abb. 3.9, B). In den NS20Y-Zellen (n=4) konnte keine spezifische OCT2-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.9, C, D).

OCT3

Im Urothel (n=5) wurde OCT3-Immunreaktivität vor allem in der gesamten Membran der Basalzellen nachgewiesen. In den Intermediärzellen wurde eine schwächere Reaktion gefunden. Die Deckzellen dagegen waren negativ (Abb. 3.10, A, B). In der Lamina propria der Harnblase (n=5) wurde OCT3-Immunreaktivität an Gefäßendothelzellen dargestellt.

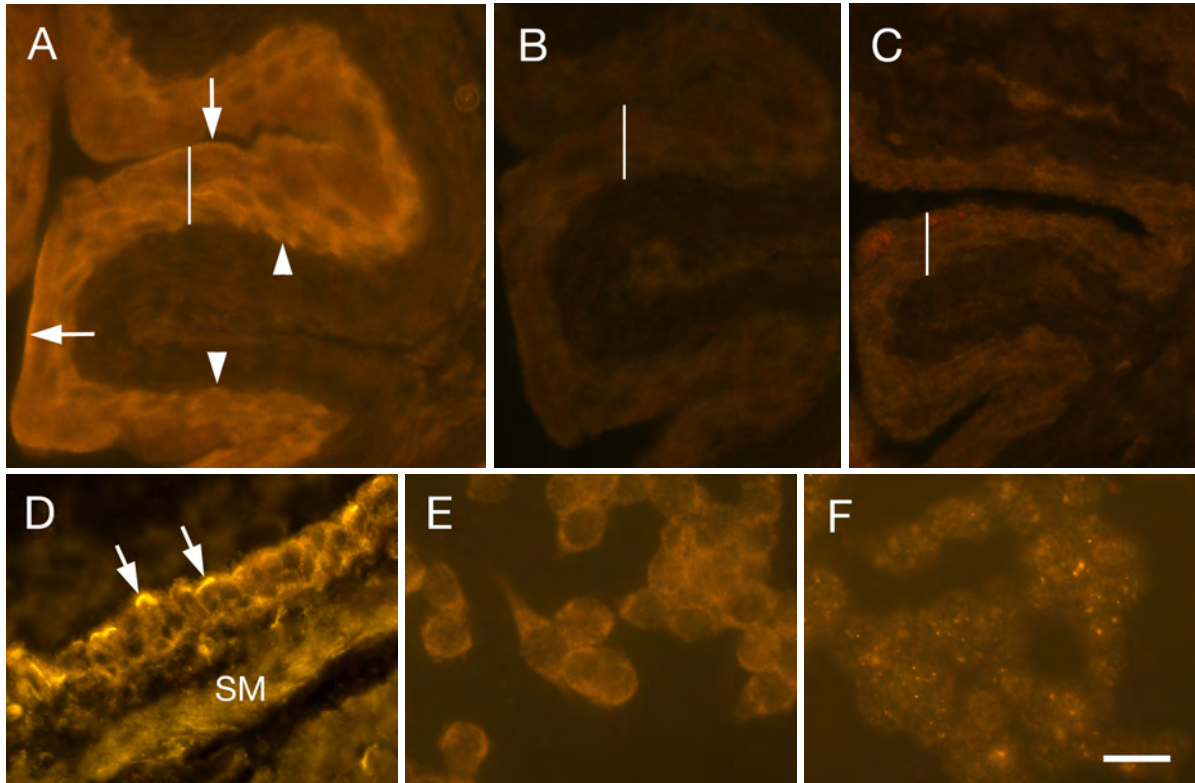


Abb. 3.8: OCT1-Immunreaktivität. (A) Im Urothel (senkrechter Balken) sind Basal- und Intermediärzellen (Pfeilköpfe) und die apikale Membran der Deckzellen (Pfeile) markiert. (B) Präabsorptionskontrolle von A. (C) Urothel (senkrechter Balken) eines OCT1/2 Knockout-Tieres. (D) Im Trachealepithel ist die apikale Membran der kinozilientragenden Zellen (Pfeile) immunreaktiv, SM = glatte Muskulatur des M. trachealis. (E) NS20Y-Zellen sind nicht immunpositiv. (F) Präabsorptionskontrolle von E. Maßstab = 50 μm .

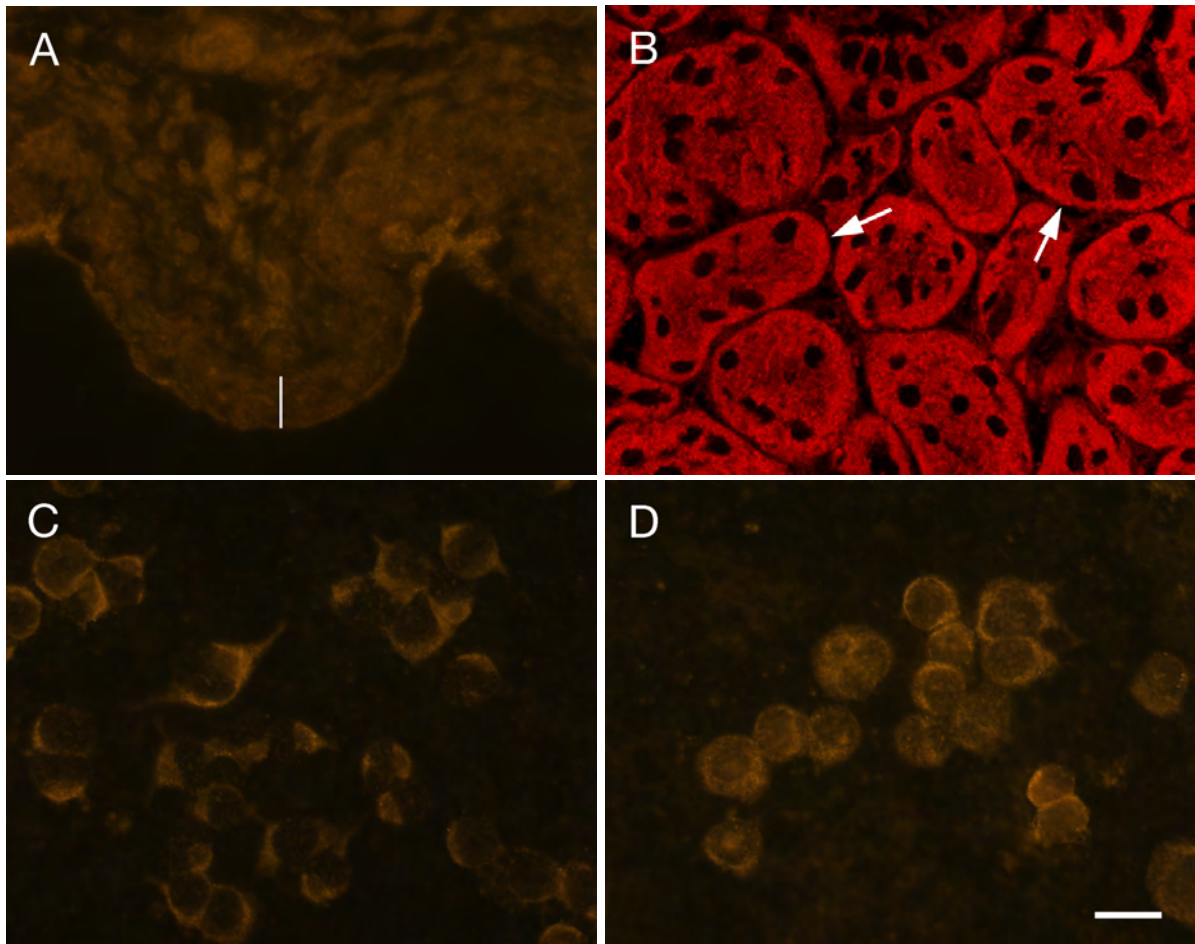


Abb. 3.9: OCT2-Immunreaktivität. (A) Im Urothel (senkrechter Balken) wird keine OCT2-Immunmarkierung nachgewiesen. (B) Als Positivkontrolle dient die OCT2-Immunreaktivität in den Tubuluszellen (Pfeile) der Niere. (C) NS20Y-Zellen sind nicht immunpositiv. (D) Präabsorptionskontrolle von C. Maßstab = 50 μm .

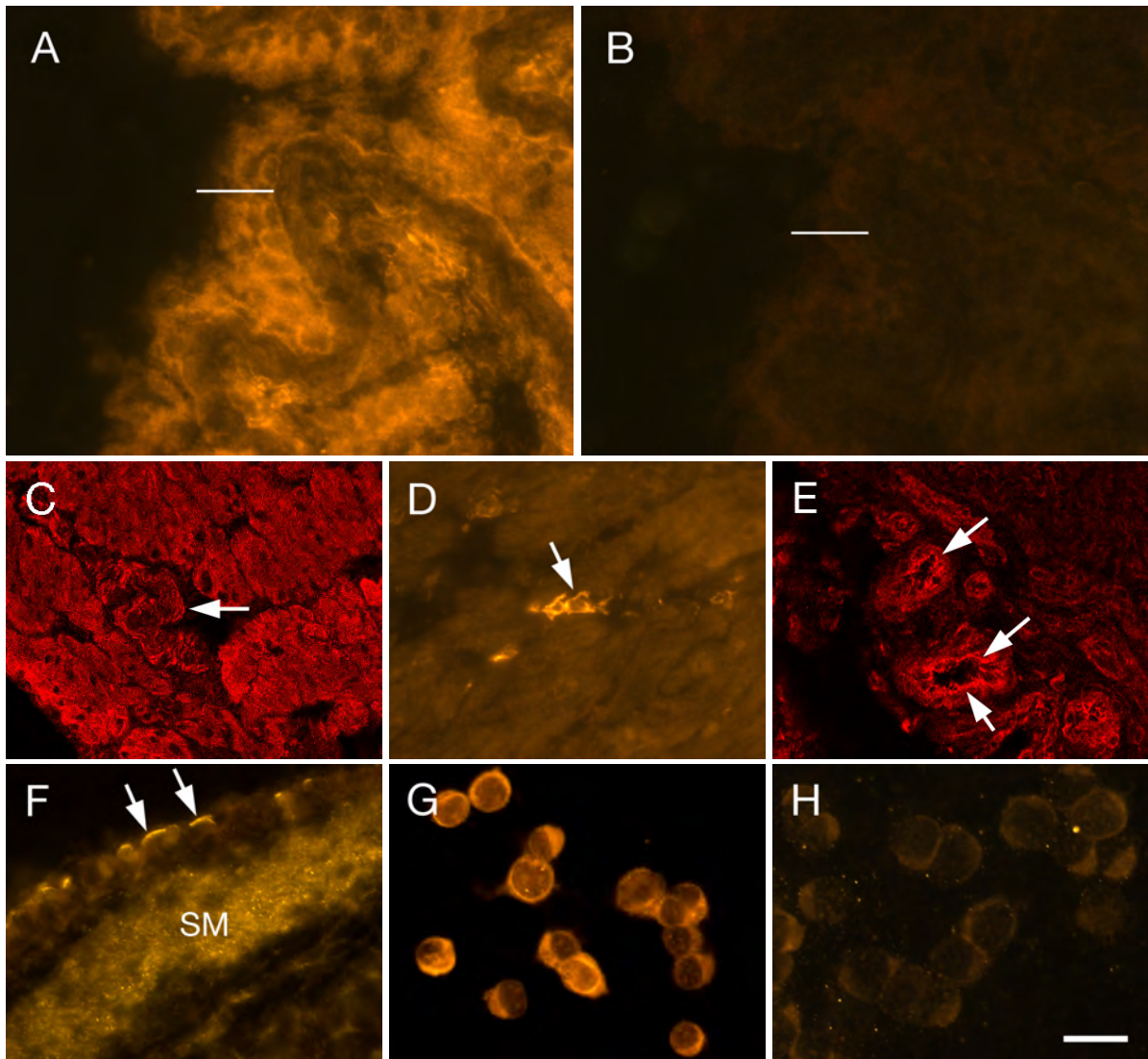


Abb. 3.10: OCT3-Immunreaktivität. (A) Im Urothel (waagrechter Balken) sind Basal- und Intermediärzellen markiert. (B) Präabsorptionskontrolle von A. (C) Immunpositive Myozyten und Nervenfasern (Pfeil) der Tunica muscularis. (D) Immunmarkierte Zellen (Pfeil), die als Fibroblasten oder IC einzuordnen sind. Um diese von den Myozyten abzugrenzen, wurde hier eine kurze Belichtungszeit gewählt, wodurch die Muskulatur negativ erscheint. (E) Immunmarkierte Gefäße (Endothel und Myozyten) der Lamina propria (C, E CLSM-Aufnahmen). (F) Im Trachealepithel sind die apikale Membran der kinozilientragenden Zellen (Pfeile) und die Myozyten des M. trachealis (SM) immunreaktiv. (G) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. (H) Präabsorptionskontrolle von G. Maßstab = 50 μm .

In der Tunica muscularis der Harnblase (n=5) wurden OCT3-immunreaktive Muskelzellen, Nervenfasern und Zellen, die nach Größe und Form als Fibroblasten oder IC (interstitielle Zellen) einzuordnen sind, nachgewiesen (Abb. 3.10, C, D, E). Die Spezifität aller Markierungen wurde mittels Präabsorptionskontrolle überprüft.

Als Positivkontrolle wurde im Trachealepithel der Maus (n=1) OCT3-Immunkolorierung in der apikalen Membran der kinezilientragenden Zellen nachgewiesen (Abb. 3.10, F). Im Zytoplasma und in der Membran der NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine OCT3-Immunkolorierung mit starker Intensität dargestellt. Mittels Präabsorptionskontrolle wurde die Spezifität dieser Markierung nachgewiesen (Abb. 3.10, G, H).

3.2.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

α 2-Untereinheit

Für die immunhistochemische Untersuchung der α 2-Untereinheit standen keine geeigneten Antikörper zur Verfügung.

α 3-Untereinheit

Mittels Immunhistochemie wurde im Urothel (n=5) keine spezifische α 3-Immunkolorierung beobachtet. In der Tunica muscularis der Harnblase (n=5) wurden zwischen Ring- und Längsmuskulatur liegende α 3-immunreaktive Ganglien nachgewiesen. An einigen Stellen der Präparate wurde eine Immunmarkierung des Peritoneums beobachtet. Die Spezifität dieser Markierungen wurde mittels Präabsorptionskontrolle überprüft (Abb. 3.11, A, B).

Als Positivkontrolle wurde im Spinalganglion der Maus (n=1) α 3-Immunkolorierung im Zytoplasma der Neurone nachgewiesen (Abb. 3.11, C). Im Zytoplasma und in der Membran der NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine α 3-Immunkolorierung mit starker Intensität dargestellt. Mittels Präabsorptionskontrolle wurde die Spezifität dieser Markierung nachgewiesen (Abb. 3.11, D, E).

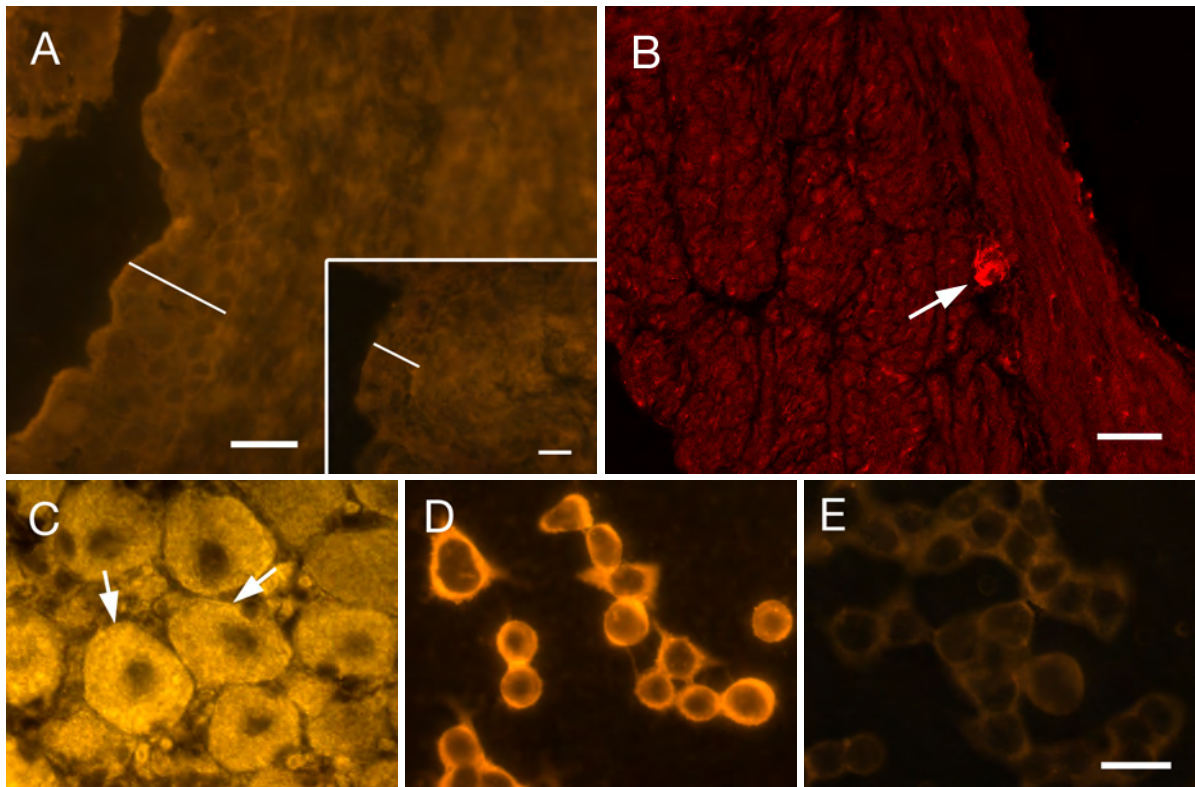


Abb. 3.11: nAChR $\alpha 3$ -Immunreaktivität. Im Urothel (A, schräger Balken) und den glatten Muskelzellen der Tunica muscularis (B, CLSM-Aufnahme) wird keine Immunmarkierung gefunden, während zwischen den Muskelschichten immunpositive Ganglien (B, Pfeil) liegen. Inset in A: Präabsorptionskontrolle von A. (C) Immunmarkierte Spinalganglienzellen (Pfeile). (D) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. (E) Präabsorptionskontrolle von D. Maßstab = 50 μm .

$\alpha 4$ -Untereinheit

Im Urothel (n=5) wurde $\alpha 4$ -Immunreaktivität in der gesamten Membran der Basal- und Intermediärzellen und an der basalen Seite der Deckzellen nachgewiesen. In der Lamina propria der Harnblase (n=5) wurden immunpositive Zellen beobachtet, die als Fibroblasten oder IC eingeordnet werden können. In der Tunica muscularis wurden $\alpha 4$ -immunreaktive Muskelzellen sowie zwischen Ring- und Längsmuskulatur liegende immunpositive Ganglien gefunden (Abb. 3.12, A, B).

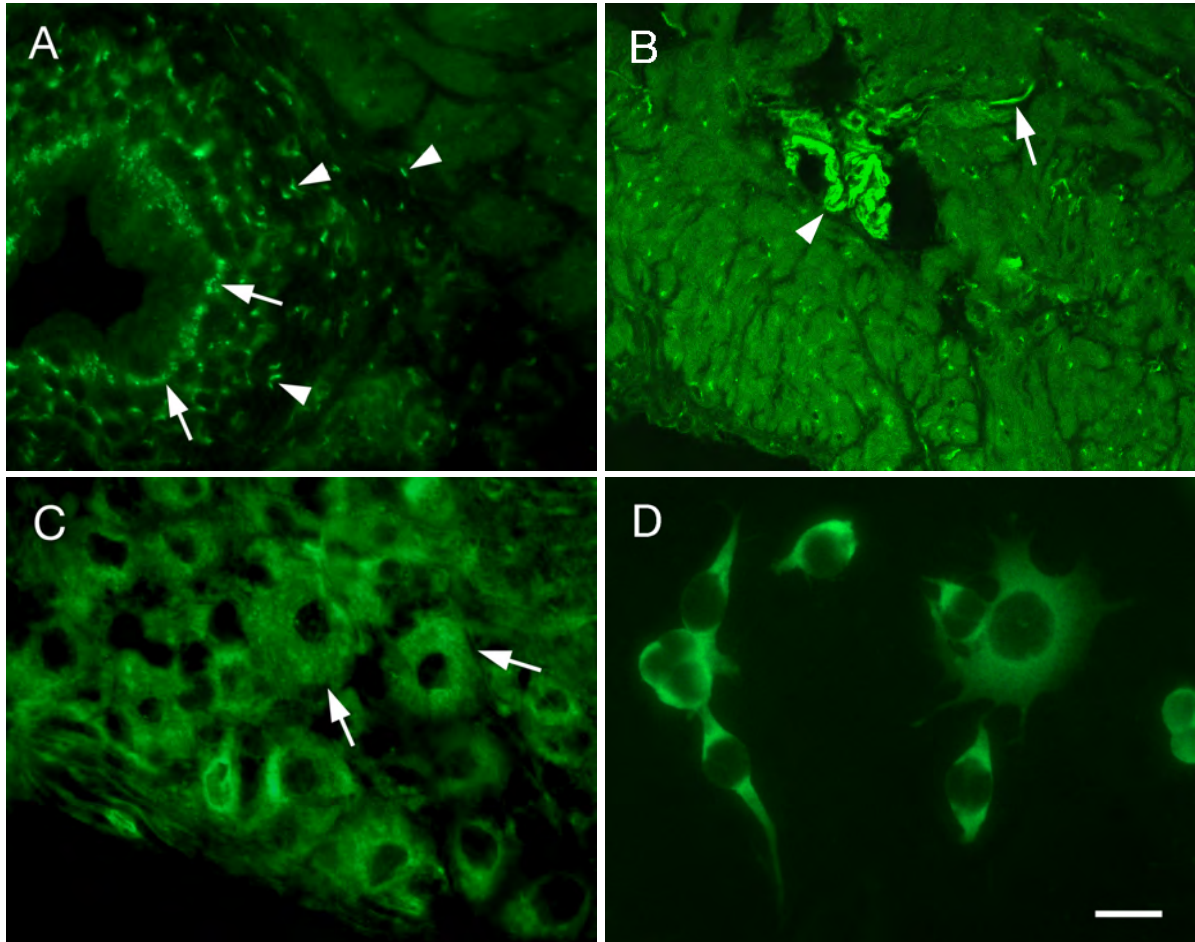


Abb. 3.12: nAChR $\alpha 4$ -Immunreaktivität. (A) Im Urothel sind Intermediär- und Basalzellen sowie die basale Seite der Deckzellen (Pfeile) immunmarkiert, in der Lamina propria liegen immunpositive Zellen (Pfeilspitzen), die nach Größe und Form als Fibroblasten oder IC einzuordnen sind. (B) In der Tunica muscularis der Harnblase sind die glatten Muskelzellen, Nervenfasern (Pfeil) und Ganglien (Pfeilspitze) immunreaktiv (CLSM-Aufnahme). (C) Immunmarkierte Spinalganglienzellen (Pfeile). (D) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. Maßstab = 50 μm .

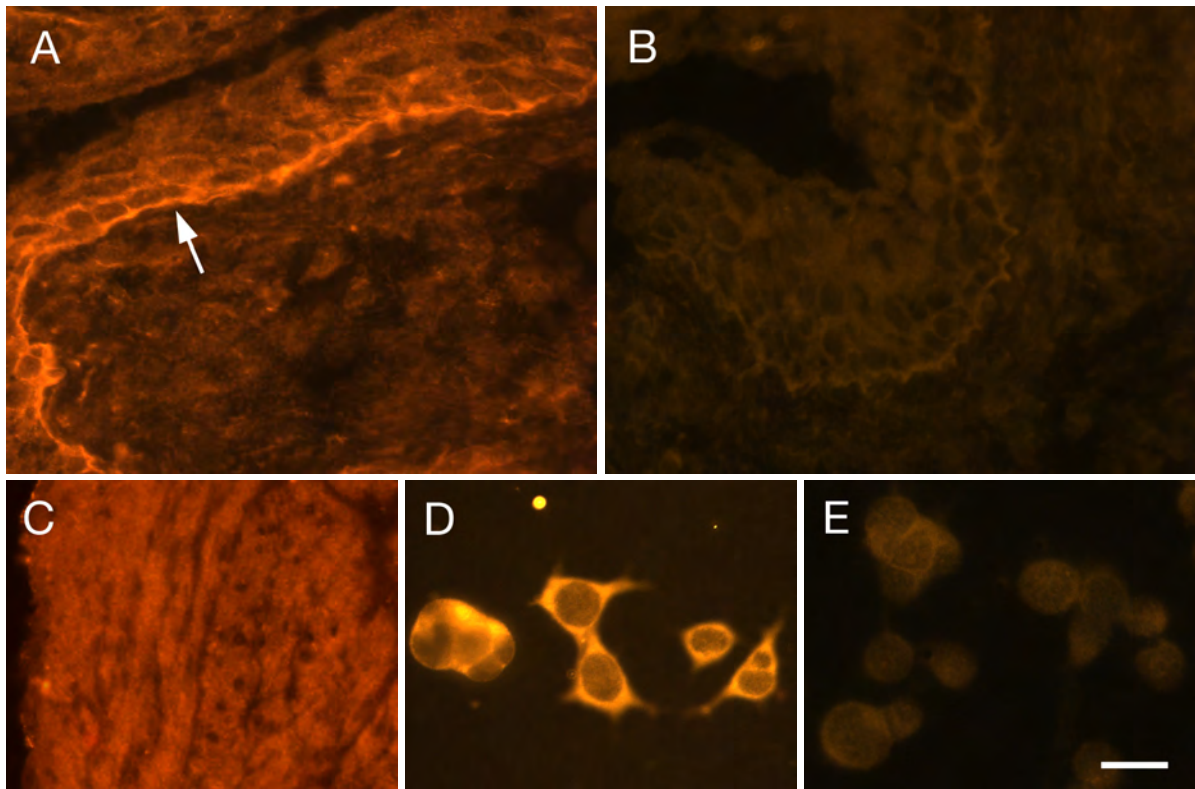


Abb. 3.13: nAChR $\alpha 5$ -Immunreaktivität (A) Im Urothel ist die Membran der Basalzellen vor allem an der basalen Seite (Pfeil) immunreaktiv. (B) Präabsorptionskontrolle von A. (C) Immunpositive Muskelzellen der Tunica muscularis der Harnblase. (D) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. (E) Präabsorptionskontrolle von D. Maßstab = 50 μm .

Als Positivkontrolle wurde im Spinalganglion der Maus (n=1) $\alpha 4$ -Immunreaktivität im Zytoplasma der Nervenzellen nachgewiesen (Abb. 3.12, C). Im Zytoplasma und in der Membran der NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine $\alpha 4$ -Immunreaktivität mit starker Intensität dargestellt (Abb. 3.12, D).

$\alpha 5$ -Untereinheit

Im Urothel (n=5) wurde eine $\alpha 5$ -Immunreaktivität in der gesamten Membran der Basalzellen nachgewiesen, wobei die Markierung der basalen Membran eine besonders starke Intensität aufwies. In der Intermediärzellschicht wurde keine

Immunmarkierung beobachtet. Die apikale Membran der Deckzellen war stellenweise immunreaktiv. In der Tunica muscularis (n=5) waren die glatten Muskelzellen $\alpha 5$ -immunmarkiert. An einigen Stellen der Präparate war das Peritoneum immunpositiv. Die Spezifität dieser Markierungen wurde mittels Präabsorptionskontrolle überprüft (Abb. 3.13, A, B).

Als Positivkontrolle wurde im Spinalganglion der Maus (n=1) $\alpha 5$ -Immunreaktivität im Zytoplasma der Ganglienzellen nachgewiesen. Im Zytoplasma und in der Membran der NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine $\alpha 5$ -Immunreaktivität mit starker Intensität dargestellt. Mittels Präabsorptionskontrolle wurde die Spezifität dieser Markierung nachgewiesen (Abb. 3.13, C, D).

$\alpha 6$ -Untereinheit

Für die immunhistochemische Untersuchung der $\alpha 6$ -Untereinheit standen keine geeigneten Antikörper zur Verfügung.

$\alpha 7$ -Untereinheit

Mittels Immunhistochemie wurde im Urothel (n=5) eine $\alpha 7$ -Immunreaktivität vor allem in der Membran der Basal- und Deckzellen nachgewiesen. In der Tunica muscularis der Harnblase (n=5) wurden $\alpha 7$ -immunpositive Muskelzellen und Nervenfasern dargestellt. Häufig wurde eine Immunmarkierung des Peritoneums beobachtet. Die Spezifität dieser Markierungen wurde mittels Präabsorptionskontrolle überprüft (Abb. 3.14, A, B).

Als Positivkontrolle wurde im Spinalganglion der Maus (n=1) $\alpha 7$ -Immunreaktivität im Zytoplasma der Neurone nachgewiesen (Abb. 3.14, C). Im Zytoplasma und in der Membran der NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine $\alpha 7$ -Immunreaktivität mit starker Intensität dargestellt. Mittels Präabsorptionskontrolle wurde die Spezifität dieser Markierung nachgewiesen (Abb. 3.14, D, E).

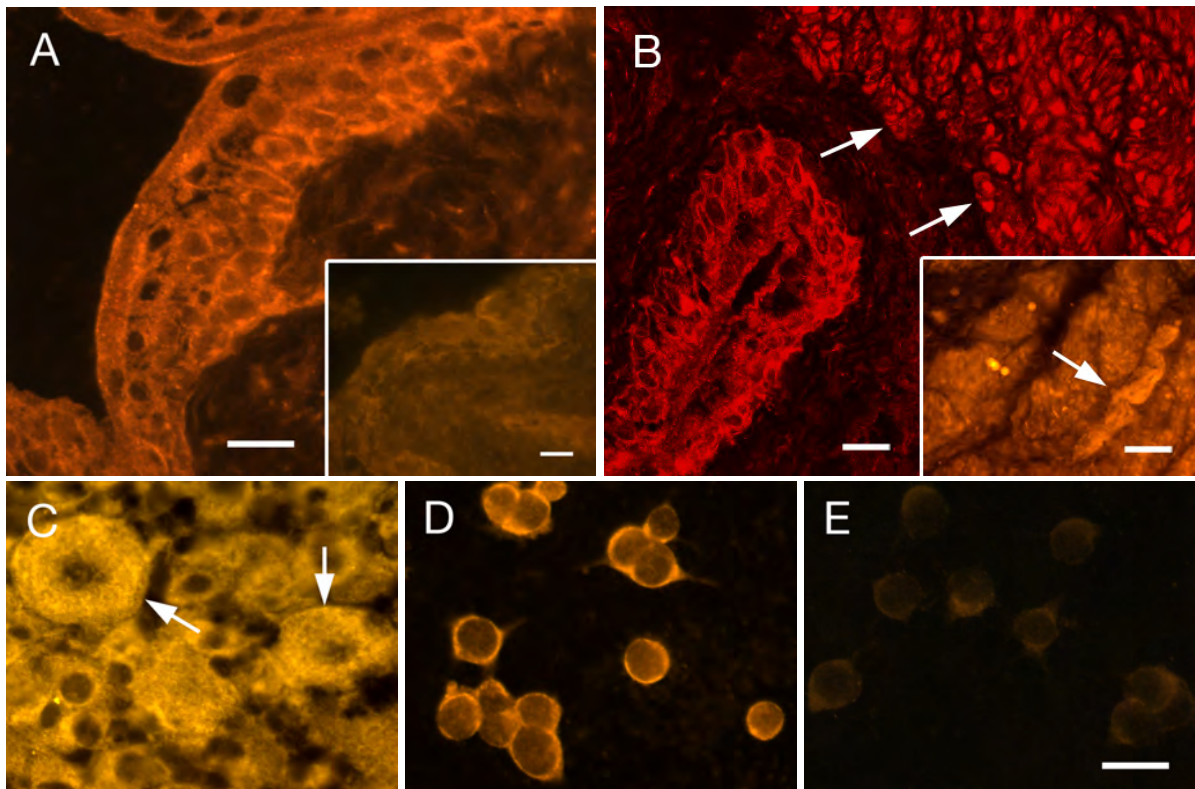


Abb. 3.14: nAChR $\alpha 7$ -Immunreaktivität (A) Im Urothel sind Basal- und Deckzellen immunreaktiv. Inset in A: Präabsorptionskontrolle von A. In der Tunica muscularis der Harnblase sind (B, CLSM-Aufnahme) die glatten Muskelzellen (Pfeile) und (Inset in B) die Nervenfasern (Pfeil) immunpositiv. (C) Immunmarkierte Spinalganglienzellen (Pfeile). (D) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. (E) Präabsorptionskontrolle von D. Maßstab = 50 μm .

$\alpha 9$ -Untereinheit

Im Urothel (n=5) wurde $\alpha 9$ -Immunreaktivität vor allem in der apikalen Membran der Deckzellen nachgewiesen. Intermediär- und Basalzellschicht zeigten kaum Reaktion. In der Tunica muscularis der Harnblase (n=5) wurden schwach $\alpha 9$ -immunreaktive Muskelzellen dargestellt. Im Mesothel wurde dagegen regelmäßig eine starke Immunmarkierung beobachtet. Die Spezifität dieser Markierungen wurde mittels Präabsorptionskontrolle überprüft (Abb. 3.15, A, B, C).

Als Positivkontrolle wurde in der Haut der Maus (n=1) $\alpha 9$ -Immunreaktivität

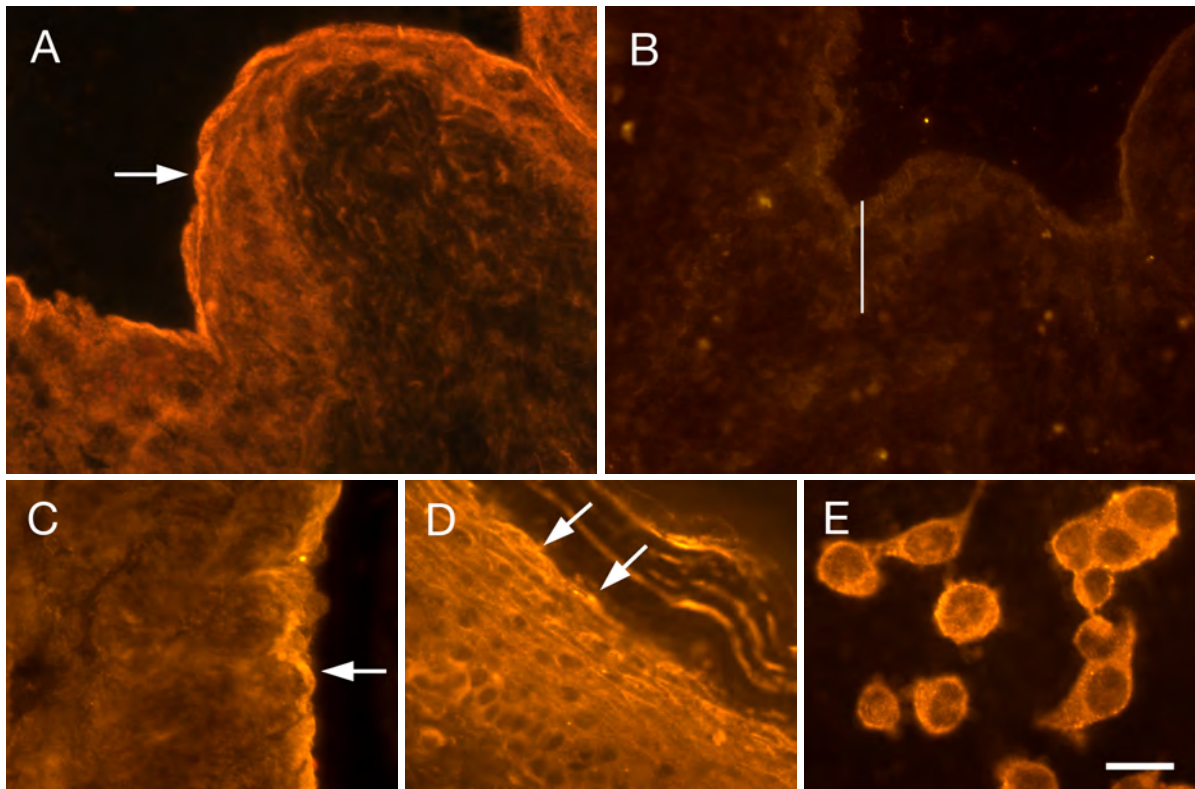


Abb. 3.15: nAChR $\alpha 9$ -Immunreaktivität. (A) Im Urothel ist die apikale Membran der Deckzellen (Pfeil) immunreaktiv. (B) Präabsorptionskontrolle von A, Urothel = senkrechter Balken. (C) Immunpositive Mesothelzellen (Pfeil) in der Tunica serosa der Harnblase. (D) Immunmarkierte Keratinozyten (Pfeile). (E) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. Maßstab = 50 μm .

in den Keratinozyten nachgewiesen (Abb. 3.15, D). Im Zytoplasma und in der Membran der NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine $\alpha 9$ -Immunreaktivität mit starker Intensität dargestellt (Abb. 3.15, E).

$\alpha 10$ -Untereinheit

Im Urothel (n=5) wurde $\alpha 10$ -Immunreaktivität vor allem in der gesamten Membran der Basalzellen und in der apikalen Membran der Deckzellen nachgewiesen. In der Tunica muscularis der Harnblase (n=5) wurden $\alpha 10$ -immunreaktive Muskelzellen und Nervenfasern dargestellt. Die Spezifität dieser Markierungen wurde

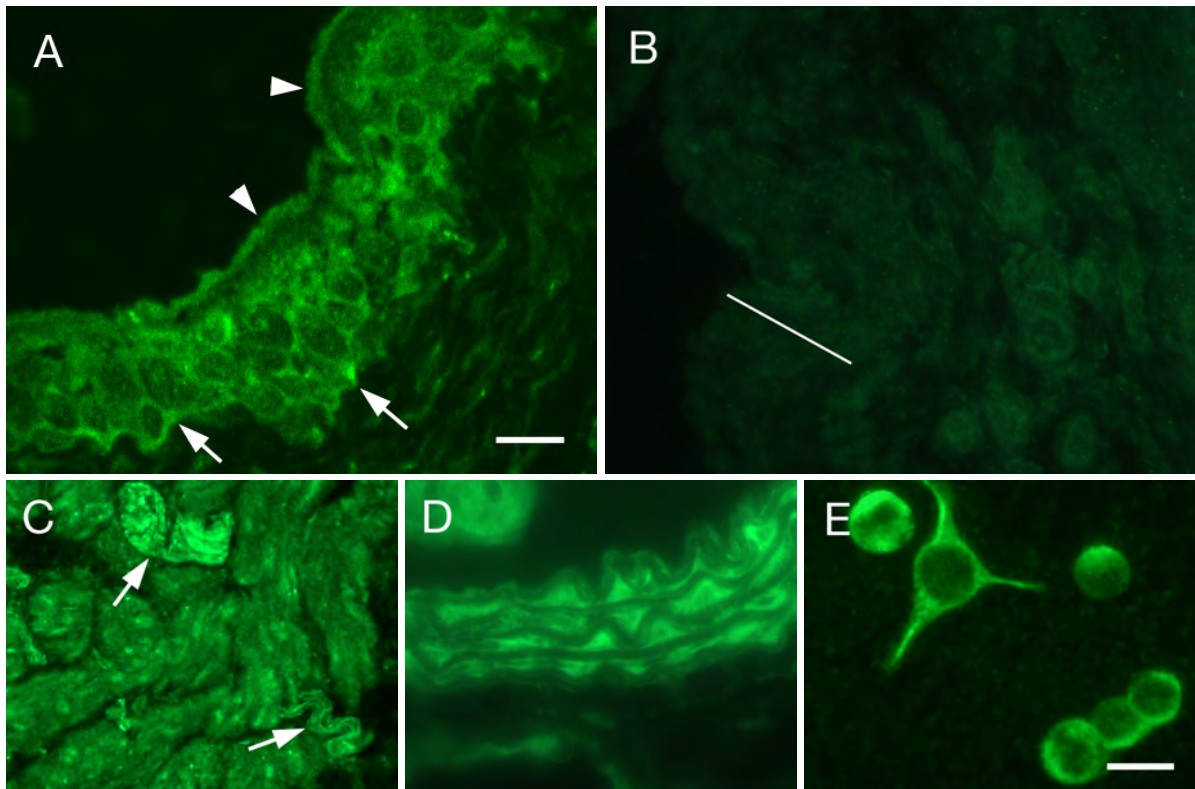


Abb. 3.16: nAChR $\alpha 10$ -Immunreaktivität. (A) Im Urothel sind die Basalzellen (Pfeile) und die apikale Membran der Deckzellen (Pfeilspitzen) immunreaktiv (CLSM-Aufnahme). (B) Präabsorptionskontrolle von A (schräger Balken = Urothel). (C) In der Tunica muscularis sind Myozyten und Nervenfasern (Pfeile) immunpositiv. (D) Immunmarkierte glatte Muskelzellen der Aorta. (E) Immunmarkierte NS20Y-Zellen. Maßstab = 50 μm .

mittels Präabsorptionskontrolle überprüft (Abb. 3.16, A, B, C).

Als Positivkontrolle wurde in der Aorta der Maus (n=1) $\alpha 10$ -Immunreaktivität in den glatten Muskelzellen nachgewiesen (Abb. 3.16, D). Im Zytoplasma und in der Membran der NS20Y-Zellen (n=4) wurde eine $\alpha 10$ -Immunreaktivität mit starker Intensität dargestellt (Abb. 3.16, E).

4 Diskussion

4.1 Das cholinerge System in der neuronalen Zelllinie NS20Y

4.1.1 Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin

Im parasympathischen Nervensystem vermittelt VACHT den Import von ACh in präsynaptische Speichervesikel. VACHT wurde in Nervenendigungen an der motorischen Endplatte in Ratte und Mensch (Schäfer et al. 1995, 1998, Weihe et al. 1996, Arvidsson et al. 1997) und in vagalen Nervenendigungen der quergestreiften Ösophagmuskulatur der Maus (Breuer et al. 2004) nachgewiesen. Subzellulär ist VACHT in Neuronen hauptsächlich in synaptischen Vesikeln zu finden, in neuronalen Modell-Zelllinien ist er in Mikrovesikeln lokalisiert (Gilmor et al. 1996, Weihe et al. 1996, Liu & Edwards 1997, Prado et al. 2002). In der Zelllinie NS20Y, die in der vorliegenden Arbeit als Modell neuronaler Zellen dient, wurde erwartungsgemäß VACHT-mRNA mittels RT-PCR und VACHT-Protein mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Da VACHT immunhistochemisch im Zytoplasma lokalisiert wurde, lässt sich ein Vorhandensein in Mikrovesikeln wie bei PC12-Zellen (Liu & Edwards 1997) vermuten.

Der hochaffine Cholintransporter CHT1 vermittelt die Aufnahme des zur ACh-Synthese nötigen Cholin in cholinerge Nervenendigungen (Apparsundaram et al. 2000, Okuda et al. 2000). Hier konnte kürzlich im Vorderhorn des Rückenmarks und an der motorischen Endplatte der Ratte eine Kolo-kalisation von VACHT und CHT1 nachgewiesen werden (Lips et al. 2002). In PC12-Zellen konnte gezeigt werden, dass sich CHT1 zum einen Teil in der Plasmamembran, aber hauptsächlich in einem Teil der VACHT-haltigen Vesikel befindet (Bravo et al. 2004). Im Zytoplasma der NS20Y-Zellen konnten wir ebenfalls CHT1-mRNA mittels RT-PCR und CHT1-

Protein immunhistochemisch nachweisen (unveröffentlichtes Ergebnis), so dass auch hier eine Kolo-kalisation von CHT1 und VACHT in Vesikeln wahrscheinlich ist. Zu dieser Kolo-kalisation existieren zwei Hypothesen: VACHT transloziert nicht nur ACh, sondern mit geringer Affinität auch Cholin in Vesikel. Das dort wahrscheinlich funktionslose Cholin könnte durch CHT1 aus dem Vesikel ins Zytoplasma zurücktransportiert werden (Ribeiro et al. 2003, Bravo et al. 2004). Ein anderer Grund für die Kolo-kalisation könnte sein, dass bei der exozytotischen Freisetzung von ACh durch das Verschmelzen der Vesikelmembran mit der Plasmamembran CHT1 in die Zellmembran inseriert wird, was wiederum zu einer vermehrten Cholin-Aufnahme in die Zelle führen würde (Ferguson et al. 2003, Ribeiro et al. 2003, Ferguson & Blakely 2004).

Die ACh-Freisetzung durch VACHT-vermittelte Exozytose ist im neuronalen cholinergen System gut etabliert (Anderson et al. 1983, Marshall & Parsons 1987, Erickson et al. 1994). Es wurde jedoch auch das Vorkommen aller drei OCT und des Mediatophor in nervalen Strukturen und neuronalen Zelllinien beschrieben (Israel & Lesbats 1981, Wu et al. 1998, Mooslehner & Allen 1999, Chen et al. 2001, Vialou et al. 2004), die als alternative oder zusätzliche Freisetzungsmechanismen von ACh dienen können.

Die OCT sind polyspezifische Membranproteine, die eine Vielzahl von Substraten, unter anderem auch das Kation ACh transportieren (Wessler et al. 2001, Koepsell & Endou 2004, Lips et al. 2005). Obwohl die drei OCT vor allem im non-neuronalen System vorkommen, konnte insbesondere OCT3 auch im neuronalen System nachgewiesen werden (Vialou et al. 2004). Die physiologische Bedeutung von OCT3 wurde an einer Studie mit OCT3-KO-Mäusen gezeigt: In Neuronen der Area postrema, die an der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes beteiligt sind, wurde OCT3 nachgewiesen. Hierdurch wird die veränderte Salz- und Wasseraufnahme der KO-Tiere erklärt (Haag et al. 2004, Vialou et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit in den neuronalen NS20Y-Zellen wurde die OCT3-mRNA mittels RT-PCR und immunhistochemisch das OCT3-Protein in der Zellmembran nachgewiesen. Mittels elektrophysiologischer Methoden konnte bisher jedoch noch

nicht direkt gezeigt werden, dass OCT3 in der Lage ist, ACh freizusetzen. Während viele Neuronen des Plexus submucosus und myentericus im Intestinum der Maus OCT1 exprimieren (Chen et al. 2001), wurde in den NS20Y-Zellen keine mRNA und auch keine immunhistochemische Markierung von OCT1 und OCT2 gefunden.

Das Mediatophor ist ein Proteolipid, das sich aus fünf c-Untereinheiten der V-ATPase zu einem Homopolymer zusammensetzt und nach Insertion in die Plasmamembran ACh transportieren kann (Israel et al. 1986, Morel 2003). Neuroblastomzellen N18TG-2, die normalerweise kein ACh freisetzen können, waren nach Transfektion des Mediatophor zur kalziumabhängigen ACh-Freisetzung fähig (Malo & Israel 2003). Die Neuroblastomzellen NS20Y, die ACh synthetisieren und freisetzen, exprimieren die c-Untereinheit, wie in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR gezeigt werden konnte. Die V-ATPase ist allerdings ein nahezu ubiquitäres Enzym. Entscheidend für die ACh-Freisetzung ist die subzelluläre Lokalisation der c-Untereinheiten in der Zellmembran, die mittels Nachweis auf mRNA-Ebene nicht dargestellt werden konnte. Deshalb kann in den NS20Y-Zellen von einem Nachweis der c-Untereinheit nicht auf eine ACh-Freisetzung durch das Mediatophor geschlossen werden.

4.1.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurden in den NS20Y-Zellen alle bisher bei Säugetieren bekannten α -Untereinheiten des neuronalen nAChR ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$) untersucht. Die Zelllinie diente zur Detektion der molekularen Grundlagen der nAChR im neuronalen System der Maus. Entsprechend ihrer α -BTX-Sensitivität wurden die nAChR in α -BTX-sensitive Rezeptoren (Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$) und α -BTX-insensitive Rezeptoren (Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 6$) unterteilt (Dani 2001, Gotti & Clementi 2004).

Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 6$ der α BTX-insensitiven nAChR

Mittels in-situ-Hybridisierung wurde gezeigt, dass die $\alpha 2$ -Untereinheit in vielen Regionen des ZNS wie den Neuronen von Neokortex, Basalganglien, Septum,

Amygdala, Bulbus olfactorius und Hirnstamm exprimiert wird, während die Untereinheit in Neuronen des Striatum nicht vorkommt (Ishii et al. 2005). In den murinen Neuroblastomzellen NS20Y wurde keine mRNA der $\alpha 2$ -Untereinheit nachgewiesen, wobei die mitgeführte Positivkontrolle am Rückenmark eine deutliche Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit zeigte.

Die $\alpha 3$ -Untereinheit ist in autonomen Ganglien und Teilen des Gehirns weit verbreitet (Wada et al. 1989, Rust et al. 1994, Wang et al. 2002b). Das Vorkommen in autonomen Ganglien verschiedener Spezies lässt auf eine wichtige Rolle der $\alpha 3$ -Untereinheit bei der schnellen synaptischen Übertragung schließen (Del Signore et al. 2002, 2004). Die Gene für die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 4$ liegen im Cluster vor, wie bei verschiedenen Spezies (Mensch, Rind, Ratte, Maus und Huhn) gezeigt wurde (Boulter et al. 1990, Couturier et al. 1990, Eng et al. 1991, Campos-Caro et al. 1997). Bei der Maus liegt dieses Cluster auf Chromosom 9, beim Menschen auf Chromosom 15 (Eng et al. 1991). Bei Mensch und Rind überlappen außerdem die Gene von $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zum Teil (Campos-Caro et al. 1997, Duga et al. 2001). Die daraus zu erwartende Koexpression der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Untereinheiten wurde mittels mRNA-Hybridisierung in einigen Regionen des ZNS (Cerebellum, Thalamus, u.a.) und in autonomen Ganglien bestätigt (Flora et al. 2000). Die funktionelle Verknüpfung der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zeigt sich nicht nur in der Anordnung ihrer Gene, sondern auch in der häufigen Zusammenstellung dieser beiden Untereinheiten zu Rezeptoren (Solda et al. 2005), wie sie zuerst in *Xenopus*-Oozyten gezeigt wurde (Gerzanich et al. 1998).

Die NS20Y-Zellen exprimieren sowohl die $\alpha 3$ - als auch die $\alpha 5$ -Untereinheit, wie in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen wurde. Rezeptoren, die als α -Untereinheit nur die $\alpha 3$ -Untereinheit enthalten, können in einer Kombination mit β -Untereinheiten vorliegen ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 3\beta 4$), wie bereits in parasymphathischen Neuronen der Ratte gezeigt wurde (Poth et al. 1997). Die $\alpha 5$ -Untereinheit kann nicht wie die anderen α -Untereinheiten mit nur einer anderen Untereinheit einen funktionellen Rezeptor bilden, sondern benötigt α - und β -Untereinheiten (Conroy et al. 1992, Groot-Kormelink

et al. 1998). Daher ist in den NS20Y-Zellen von einer Bildung komplexer Heteropentamere aus den Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und β auszugehen ($\alpha 3\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\alpha 5\beta 4$, $\alpha 3\alpha 5\beta 2\beta 4$), wie sie im ZNS bereits beschrieben wurden (Conroy et al. 1995, Wang et al. 1996, Conroy & Berg 1998). In diesen Rezeptoren scheint die $\alpha 5$ -Untereinheit nicht mit den cholinergen Liganden zu interagieren, sondern vielmehr die Ligandenaffinität zu modifizieren (Flora et al. 2000).

Sowohl $\alpha 5$ -KO- als auch $\alpha 5\beta 4$ -Doppel-KO-Mäuse sind lebensfähig, fertil und zeigen keine gravierenden phänotypischen Auffälligkeiten (Salas et al. 2003, Kedmi et al. 2004), was eine Kompensation des Gendefekts durch andere Untereinheiten vermuten lässt. Bei Untersuchungen mit Nikotin, das dosisabhängig tonisch-klonische Krämpfe auslösen kann, wird jedoch eine deutliche Resistenz der KO-Mäuse gegenüber der epileptogenen Wirkung von Nikotin beschrieben (Kedmi et al. 2004).

Die $\alpha 4$ -Untereinheit ist im Gehirn verschiedener Spezies weit verbreitet (Gotti & Clementi 2004) und kommt in der Maus unter anderem in Kortex, Hippocampus und Thalamus vor (Ross et al. 2000, Salas et al. 2003). Auch in NS20Y-Zellen wurde die $\alpha 4$ -Untereinheit auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen. Der wichtigste und am weitesten verbreitete Rezeptortyp im Gehirn von Ratte und Maus ist $\alpha 4\beta 2$ (Perry et al. 2002, Gotti & Clementi 2004). In ZNS-Regionen, die an der Schmerzleitung beteiligt sind (z. B. Thalamus, Hinterhorn des Rückenmarks), zeigen sowohl $\alpha 4$ -KO- als auch $\beta 2$ -KO-Mäuse einen Verlust von hochaffinen Nikotin-Bindungsstellen (Marubio & Changeux 2000). Der antinozizeptive Effekt von Nikotin ist bei diesen Tieren stark reduziert, wie in den in der Verhaltensforschung üblichen „hot plate“- und „tail flick“-Tests gezeigt wurde (Marubio et al. 1999). Hieraus wird geschlossen, dass die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\beta 2$ wichtige, wenn auch nicht die einzigen Komponenten in der Schmerzantwort sind, und dass diese Untereinheiten die antinozizeptive Wirkung von Nikotin vermitteln. In den NS20Y-Zellen können außer den klassischen neuronalen $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren auch weniger häufige Rezeptoren wie $\alpha 4\beta 4$ (Zwart & Vijverberg 1997) oder $\alpha 4\beta 2\beta 3\beta 4$ (Forsayeth & Kobrin 1997) gebildet werden. Da die $\alpha 5$ -Untereinheit häufig mit

der $\alpha 4$ -Untereinheit einen funktionellen Rezeptor bildet (Dani 2001) und von den NS20Y-Zellen ebenfalls exprimiert wird, sind auch $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ -Rezeptoren (Lukas et al. 1999) denkbar.

Auch die $\alpha 6$ -Untereinheit wurde im ZNS nachgewiesen. Eine funktionelle Expression von $\alpha 6$ -haltigen Rezeptoren wurde erstmals in Oozyten von *Xenopus laevis* gezeigt (Gerzanich et al. 1997). Im Gehirn von Maus und Ratte wurde $\alpha 6$ -mRNA besonders in katecholaminergen Kerngebieten (Substantia nigra, Tegmentum und Locus coeruleus) und im Striatum gefunden (Le Novere et al. 1996, Champtiaux et al. 2002, Salas et al. 2003, Gotti et al. 2005). Die NS20Y-Zellen exprimieren ebenfalls mRNA der $\alpha 6$ -Untereinheit, wie mittels RT-PCR gezeigt wurde. Da sowohl in dopaminergen Neuronen als auch in der Retina regelmäßig die Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 3$ vorkommen, kann auf eine Koexpression dieser beiden Untereinheiten geschlossen werden (Azam et al. 2002, Moretti et al. 2004). Die $\beta 3$ -Untereinheit scheint für die Zusammenstellung der $\alpha 6$ -haltigen Rezeptoren und deren Transport in die Nervenendigungen verantwortlich zu sein (Gotti et al. 2005). Da die $\beta 3$ -Untereinheit ähnlich wie die $\alpha 5$ -Untereinheit nicht mit nur einer anderen Untereinheit einen Rezeptor bilden kann, könnte in den NS20Y-Zellen die Zusammenstellung zu komplexen Heteropentameren wie $\alpha 6\beta 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$ und $\alpha 3\alpha 6\beta 3\beta 4$ in Frage kommen (Vailati et al. 1999, Kuryatov et al. 2000, Gotti et al. 2005). Weiterhin könnte die $\alpha 6$ -Untereinheit mit β -Untereinheiten ($\alpha 6\beta 2$, $\alpha 6\beta 4$) oder mit der Untereinheit $\alpha 3$ ($\alpha 3\alpha 6\beta 2$, $\alpha 3\alpha 6\beta 4$) funktionelle Rezeptoren bilden (Gerzanich et al. 1997, Fucile et al. 1998, Kuryatov et al. 2000).

In Untersuchungen mit $\alpha 6$ -KO-Mäusen wurde festgestellt, dass ungefähr 40 % aller $\alpha 6\beta 2$ -haltigen Rezeptoren im Striatum zusätzlich die $\alpha 4$ -Untereinheit enthalten (Champtiaux et al. 2003), so dass in den NS20Y-Zellen $\alpha 4\alpha 6$ -haltige Rezeptoren möglich sind (Zoli et al. 2002, Gotti et al. 2005). Da auch die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 5$ von den NS20Y-Zellen exprimiert werden, ist eine Zusammenstellung zu $\alpha 5\alpha 6\beta 2$ - oder $\alpha 4\alpha 5\alpha 6\beta 2$ -Rezeptoren möglich (Kuryatov et al. 2000, Klink et al. 2001).

Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ der α BTX-sensitiven nAChR

Wie wir mittels RT-PCR und Immunhistochemie zeigen konnten, wird die $\alpha 7$ -Untereinheit von den Neuroblastomzellen NS20Y exprimiert. Die $\alpha 7$ -Untereinheit wurde in weiten Teilen des Gehirns wie Kortex, Stammganglien und motorischem Vaguskern gefunden (Rubboli et al. 1994, Breese et al. 1997, Salas et al. 2003) und kommt in hoher Konzentration im Hippocampus vor (Albuquerque et al. 1997, Dani 2001, Tsuneki et al. 2003). $\alpha 7$ -haltige Rezeptoren zeichnen sich durch eine hohe Permeabilität für Kalziumionen aus (Castro & Albuquerque 1995, Fucile et al. 2003), wobei der Kalziumeinstrom in die Zelle zahlreiche Signalwege aktiviert (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Um diese Aktivierung zu regulieren, können $\alpha 7$ -haltige Rezeptoren schnell phosphoryliert und dephosphoryliert werden – sie sind im dephosphorylierten Zustand aktiver (Charpantier et al. 2005). Die Kalziumpermeabilität $\alpha 7$ -haltiger Rezeptoren bedingt wohl die meisten ihrer zahlreichen Funktionen (Gotti & Clementi 2004): Neben der Erregungsübertragung an Synapsen ist die $\alpha 7$ -Untereinheit am Auswachsen von Neuriten (Chan & Quirk 1993), Zellwachstum (Quirk et al. 1994), neuronaler Entwicklung und Zelltod (Berger et al. 1998) und Beeinflussung der Transmitterfreisetzung an der Präsynapse (Role & Berg 1996) beteiligt. Die Kalziumwirkung wird durch eine schnelle Desensibilisierung, die typisch für $\alpha 7$ -haltige Rezeptoren ist, begrenzt (Alkondon et al. 1997). Die $\alpha 7$ -Untereinheit bildet Homopentamere, wie an *Xenopus*-Oozyten gezeigt wurde (Seguela et al. 1993). Außerdem konnten $\alpha 7$ -haltige Heteropentamere ($\alpha 7\beta 2$, $\alpha 3\alpha 7\beta$, $\alpha 3\alpha 5\alpha 7\beta$, $\alpha 5\alpha 7\beta$, Crabtree et al. 1997, Yu & Role 1998, Khiroug et al. 2002) nachgewiesen werden. Da die NS20Y-Zellen sowohl die Untereinheit $\alpha 7$ als auch die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ exprimieren, könnten sowohl homomere $\alpha 7$ -Rezeptoren als auch Kombinationen mit den genannten Untereinheiten vorkommen. Je nach Zusammenstellung dieser Untereinheiten besitzen die Rezeptoren unterschiedliche funktionelle Eigenschaften: Zum Beispiel haben $\alpha 7\beta 2$ -Rezeptoren eine höhere Affinität zu ACh als die $\alpha 7$ -Homomere (Khiroug et al. 2002).

$\alpha 7$ -KO-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen neuroanatomischen Defekte. Allerdings fehlt bei diesen Mäusen die α -BTX-Bindungsstelle

und die nikotinabhängige schnelle Desensibilisierung der Neurone (Orr-Urtreger et al. 1997). Bei der Höhe der Nikotindosis, die einen zerebralen Krampfanfall auslöst, gibt es allerdings keinen Unterschied zu Wildtyp-Mäusen (Franceschini et al. 2002).

Die $\alpha 9$ -Untereinheit wurde erstmals 1994 in den Haarzellen der Cochlea der Ratte nachgewiesen (Elgoyhen et al. 1994). Sie kann wie die $\alpha 7$ -Untereinheit homomere Rezeptoren bilden, die sich durch eine hohe Kalziumpermeabilität auszeichnen. Die $\alpha 9$ -Untereinheit wird häufig koexprimiert mit der Untereinheit $\alpha 10$, die 2001 in Ratte (Elgoyhen et al. 2001) und Mensch (Lustig et al. 2001) kloniert und funktionell charakterisiert wurde. Obwohl die Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ nur in wenigen Regionen wie in den Haarzellen der Cochlea von Ratte (Elgoyhen et al. 2001, Oliver et al. 2001) und Mensch (Lustig et al. 2001), in der Hypophyse der Ratte (Sgard et al. 2002) und in Spinalganglien der Ratte (Lips et al. 2002) gefunden wurden, konnten wir in den NS20Y-Zellen eine Expression beider Untereinheiten mittels RT-PCR und Immunhistochemie nachweisen. Die $\alpha 10$ -Untereinheit, die eine sehr ähnliche AS-Sequenz zur $\alpha 9$ -Untereinheit besitzt, unterscheidet sich von den übrigen α -Untereinheiten insofern, als bisher nur in Kombination mit der $\alpha 9$ -Untereinheit funktionelle Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Elgoyhen et al. 2001, Sgard et al. 2002). In Expressionsstudien an *Xenopus*-Oozyten wurde gezeigt, dass die $\alpha 10$ -Untereinheit zwar kein Homomer bilden kann, aber bei der Koexpression der Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ ein im Vergleich zum homomeren $\alpha 9$ -Rezeptor 100-mal effektiverer Rezeptor gebildet wird (Elgoyhen et al. 2001). Eine Koexpression der $\alpha 10$ -Untereinheit mit den Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 6$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ dagegen ergab keine funktionellen Rezeptoren (Elgoyhen et al. 2001). Die Funktion der $\alpha 10$ -Untereinheit scheint, ähnlich der β -Untereinheiten in anderen nAChR, in der Modulation des $\alpha 9$ -haltigen Rezeptors zu liegen (Lustig 2006). In den NS20Y-Zellen können homomere $\alpha 9$ -Rezeptoren (Elgoyhen et al. 2001, Sgard et al. 2002) gebildet werden. Da auch die $\alpha 10$ -Untereinheit von der Zelllinie exprimiert wird, sind $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptoren, wie sie in den Haarzellen beschrieben wurden (Elgoyhen et al. 2001, Sgard et al. 2002), ebenfalls wahrscheinlich. Die

$\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptoren unterscheiden sich durch eine schnellere Desensibilisierung von den α -BTX-insensitiven nAChR (Elgoyhen et al. 2001). Außerdem besitzen $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptoren ein ungewöhnliches pharmakologisches Profil, dass sowohl nikotinische als auch muskarinische Eigenschaften aufweist (Elgohyen et al. 2001, Lustig et al. 2001). Für die muskarinischen Eigenschaften des Rezeptors stellt eine Interaktion der $\alpha 10$ -Untereinheit mit dem Protein Prosaposin eine mögliche Erklärung dar (Lustig 2006).

Untersuchungen an $\alpha 9$ -KO-Mäusen lassen vermuten, dass die $\alpha 9$ -Untereinheit in den äußeren Haarzellen an der Entwicklung von Synapsen beteiligt ist und Effekte des olivocochleären Systems vermittelt (Vetter et al. 1999, May et al. 2002). Anhand von $\alpha 10$ -KO-Mäusen, die kürzlich generiert wurden (Vetter et al. 2005), konnte jedoch gezeigt werden, dass die $\alpha 10$ -Untereinheit entscheidend für die olivocochleäre Neurotransmission ist und in den äußeren Haarzellen allein durch die $\alpha 9$ -Untereinheit keine suffiziente efferente Signalübermittlung möglich ist (Vetter et al. 2007).

4.2 Das cholinerge System im Urothel der Maus

4.2.1 Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin

Das Vorkommen von ACh in non-neuronalen Zellen wurde direkt mittels HPLC (high pressure liquid chromatography) oder indirekt durch das Synthesenzym ChAT in den Epithelzellen der Luftwege (Klapproth et al. 1997, Proskocil et al. 2004), des Verdauungstraktes (Nguyen et al. 2000), des Urogenitaltraktes (Wessler et al. 2003, Hanna-Mitchell et al. 2007, Lips et al. 2007), der Plazenta (Sastry & Sadavongvivad 1978) und der Epidermis (Zia et al. 2000), in Endothelzellen (Parnavelas et al. 1985, Haberberger et al. 2000, Kirkpatrick et al. 2001) und Zellen des Immunsystems (Leukozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Fujii et al. 1996, Ogawa et al. 2003), in Mesothelzellen von Perikard und Pleura (Klapproth et al. 1997), in glatten Muskelzellen der Atemwege (Wessler & Kirkpatrick 2001) und in Skelettmuskelfasern (Tucek 1982) nachgewiesen. Zum Teil sind die molekularen

Komponenten der ACh-Synthese, Speicherung und Freisetzung mit denen des neuronalen cholinergen Systems identisch (Sastry & Sadavongvivad 1978, Klapproth et al. 1997, Kawashima & Fujii 2000).

In der Harnblase konnte im Urothel von Ratte (Wessler et al. 1998), Mensch (Wessler et al. 1998, Yoshida et al. 2004, 2006, Lips et al. 2007) und Maus (Lips et al. 2007) ACh mittels HPLC-Messung nachgewiesen werden. Urotheliales ACh könnte an der Regulation von Zellfunktionen (z. B. Proliferation, Differenzierung und Adhäsion) beteiligt sein, wie sie bereits in der Haut beschrieben wurde (Grando et al. 1995, Zia et al. 2000, Nguyen et al. 2003, Kurzen et al. 2007). Im murinen Urothel stellt sich die Frage nach der Herkunft des gemessenen ACh. Für die ACh-Synthese im Urothel spricht, dass auch in anderen cholinergen Epithelien wie Bronchialepithel (Klapproth et al. 1997, Proskocil et al. 2004), Haut (Grando et al. 1993), Epithel des Verdauungstraktes (Klapproth et al. 1997) und Plazenta (Wessler et al. 1998) eine eigene ACh-Produktion beschrieben wird. Allerdings konnten wir ChAT, die in vielen Epithelien ACh synthetisiert, im Urothel auf mRNA-Ebene nicht nachweisen (Lips et al. 2007). Deshalb könnte das Urothel alternativ oder zusätzlich das von cholinergen Nervenfasern freigesetzte ACh aufnehmen. Hierfür spricht, dass in der vorliegenden Arbeit mittels Immunhistochemie in der Lamina propria dicht unter dem Urothel gelegene stark VAcHT-haltige Nervenfasern nachgewiesen wurden, was auch im Einklang mit den Untersuchungen an der Ratte steht (Beckel et al. 2005). Birder (2005) sieht ACh als einen vom Urothel gebildeten Mediator an, der die darunter liegenden afferenten Nervenfasern und den M. detrusor steuert (Birder 2005). Hier stellt sich die Frage, ob in der Maus der urotheliale ACh-Gehalt, der sich im 10^{-9} -molaren Bereich befindet (Lips et al. 2007), bei aktiver neuronaler ACh-Freisetzung (ACh-Ausschüttung im 10^{-5} -molaren Bereich, Salpeter & Eldefrawi 1973) bei der Beeinflussung des M. detrusor überhaupt eine Rolle spielen kann. Durch eine Veränderung der neuronalen Erregbarkeit (de Groat et al. 2004) könnte urotheliales ACh zumindest einen indirekten Einfluss auf die Muskulatur ausüben.

Vesikulärer Acetylcholintransporter

Lange wurde VACHT, der in cholinergen Neuronen den Import von ACh in synaptische Vesikel bestreitet (Erickson et al. 1994), nur im neuronalen System gefunden: VACHT wurde immunhistochemisch und mittels in-situ-Hybridisierung in großen Teilen des Gehirns und Rückenmarks der Ratte (Arvidsson et al. 1997, Hahm et al. 1997, Ichikawa et al. 1997) und in den Nervenfasern im Respirationstrakt, Verdauungstrakt, Pankreas, Herz und Urogenitaltrakt nachgewiesen (Schäfer et al. 1998). In nicht cholinerg innervierten Geweben wie Leber, Niere und lymphoidem System der Ratte (Schäfer et al. 1998) und in der Fibroblasten-Zelllinie COS des Affen (Roghani et al. 1998) konnte dagegen VACHT mittels Immunhistochemie nicht dargestellt werden.

Im Jahr 2000 wurde erstmals im Endothel der Arteria pulmonalis von Mensch und Schwein die Expression von VACHT-mRNA beschrieben (Haberberger et al. 2000). Ob VACHT im non-neuronalen System an der ACh-Freisetzung beteiligt ist, ist jedoch umstritten (Wessler et al. 2001, Song et al. 2003). Auch im Atemwegsepithel, wo VACHT mittels RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen wurde, ist seine Rolle in der ACh-Freisetzung noch unklar (Proskocil et al. 2004). Wessler et al. konnten zeigen, dass der VACHT-Inhibitor Vesamicol (Prior et al. 1992) die ACh-Sekretion in der Plazenta nicht beeinflusst, woraus die Autoren schließen, dass hier VACHT nicht an der ACh-Freisetzung beteiligt ist (Wessler et al. 2001). In der Ratte kommen VACHT-mRNA und -Protein in Teilen der Plazenta (Trophoblast, mesenchymale Zellen und Dottersackepithel) vor, werden aber nicht in allen Zellen gefunden, die auch ChAT exprimieren. Auch hier wird vermutet, dass in diesen Zellen ACh über andere Mechanismen, beispielsweise die OCT oder das Mediatophor, freigesetzt wird (Pfeil et al. 2004).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, kommen in der Harnblase der Maus VACHT-mRNA und -Protein nicht im Urothel vor. Hier muss die Freisetzung des ACh also durch alternative Mechanismen bestritten werden, wobei insbesondere die polyspezifischen OCT und das Mediatophor in Frage kommen. Auch im Urothel von Mensch (Lips et al. 2007) und Ratte (Hanna-Mitchell et al.

2007) wurde kürzlich nachgewiesen, dass VACHT hier nicht vorkommt. Hanna-Mitchell et al. (2007) konnten außerdem zeigen, dass die ACh-Freisetzung durch Brefeldin, einen Inhibitor der Vesikelformation, nicht gehemmt wird. Die Autoren schließen daraus ebenfalls, daß ACh im Urothel nicht in synaptischen Vesikeln gespeichert wird, sondern durch andere Wege wie beispielsweise OCT3 freigesetzt wird.

Organische Kationentransporter

Die OCT sind für die renale und hepatische Exkretion verschiedenster kationischer Xenobiotika wie β -Lactam-Antibiotika, Schleifendiuretika, Thiaziddiuretika, nicht-steroidale Antiphlogistika und vieler anderer verantwortlich (Burckhardt & Wolff 2000, Dresser et al. 2001). Auch viele endogene, physiologisch wichtige Substanzen (Amino- und Fettsäuren, Neurotransmitter, Nukleotide, Prostaglandine, Dicarboxylate, Carnitin u.a.) werden durch die OCT transportiert (Eraly et al. 2004). Dass ACh im non-neuronalen System ein Substrat für die OCT ist, wurde in mehreren unabhängigen Arbeiten bestätigt (Wessler et al. 2001, Lips et al. 2005, Müller et al. 2005), es scheint jedoch in verschiedenen Spezies und Geweben zu differieren, welche der drei OCT die ACh-Freisetzung vermitteln.

In der Harnblase der Maus wurden, wie die vorliegende Arbeit zeigt, die mRNA und das Protein von OCT1 und OCT3 mittels RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen. OCT2 dagegen wurde nicht detektiert. Hanna-Mitchell et al. (2007) beschreiben im Urothel der Ratte eine Expression von OCT3, nicht aber von OCT1 und OCT2. Im humanen Urothel wurde, wie bei der Maus, eine Expression von OCT1 und OCT3 nachgewiesen (Lips et al. 2007). Unsere Ergebnisse am murinen Urothel stehen im Einklang mit Untersuchungen an der humanen Plazenta, bei der ebenfalls die non-neuronale ACh-Freisetzung vorrangig durch OCT1 und OCT3 vermittelt werden soll (Wessler et al. 2001). Die Autoren beschreiben hier eine Inhibition der ACh-Freisetzung durch Anti-OCT1- und Anti-OCT3-Oligonukleotide, während Anti-OCT2-Oligonukleotid keine Auswirkungen auf die ACh-Freisetzung hat. Der OCT1-Inhibitor Chinin und der OCT3-Inhibitor

Corticosteron bewirken ebenfalls eine Hemmung der ACh-Freisetzung, auf die der OCT2-Inhibitor Guanidin kaum Effekt hat (Wessler et al. 2001). Auch im Darmepithel und in basophilen Blutzellen der Maus wurden mittels RT-PCR die mRNA von OCT1 und OCT3, nicht aber von OCT2 nachgewiesen (Chen et al. 2001, Schneider et al. 2005). Im Bronchialepithel der Maus wurde immunhistochemisch vor allem OCT1 gefunden, während OCT3 schwächer und OCT2 nicht spezifisch nachgewiesen werden konnten (Kummer et al. 2006). Im Bronchialepithel von Ratte und Mensch kommen alle drei OCT in den kinozilientragenden Zellen vor, wie mittels RT-PCR und Immunhistochemie gezeigt wurde (Lips et al. 2005). Im Expressionssystem von *Xenopus*-Oozyten wurde mittels elektrophysiologischer Messungen (two-electrode voltage-clamp) bei hOCT1, rOCT1, hOCT2 und rOCT2 ein ACh-Influx und -Efflux nachgewiesen, während hOCT3 und rOCT3 keinen Unterschied zur Negativkontrolle aufwiesen (Lips et al. 2005). Dieser ACh-Transport konnte durch Corticosteroide wie Budenosid gehemmt werden. Lips et al. schlossen aus diesen Beobachtungen, dass im Atemwegsepithel ACh ein Substrat für OCT1 und OCT2, aber nicht für OCT3 ist. Im Bronchialepithel der Maus wurde außerdem gezeigt, dass OCT1/2-Doppel-KO-Mäuse einen im Vergleich zum Wildtyp doppelt so hohen ACh-Gehalt im Epithel aufweisen, was eine Beteiligung von OCT1 und/oder OCT2 an der ACh-Freisetzung bestärkt (Kummer et al. 2006). Da in der murinen Harnblase OCT2 nicht exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob hier nur OCT1 ACh transportiert, oder ob auch OCT3 daran beteiligt ist.

Im Urothel der Maus konnte mittels Immunhistochemie gezeigt werden, dass OCT1 sowohl in der apikalen Membran der Deckzellen als auch in der gesamten Membran der Intermediär- und Basalzellen lokalisiert ist (Abb. 4.1). Die Spezifität dieser Markierungen wurde erfolgreich an der Harnblase einer OCT1/2-Doppel-KO-Maus (Jonker et al. 2003) überprüft. Die Lokalisation von OCT1 im Urothel macht eine OCT1-vermittelte Freisetzung von ACh in das Harnblasenlumen, ins Interstitium der Mucosa und in die Lamina propria möglich. Da die OCT Substanzen in beide Richtungen transportieren können, kann durch apikal lokalisierte OCT1 sowohl eine ACh-Freisetzung ins Harnblasenlumen als auch eine Aufnahme

von ACh aus dem Lumen nicht ausgeschlossen werden. Eine luminale Sekretion von ACh wird in kinozilientragenden Zellen des Bronchialepithel von Mensch und Maus mittels apikal gelegenen OCT1 angenommen (Lips et al. 2005, Kummer et al. 2006). In der Harnblase, in der sich je nach Füllungszustand große Mengen an Harn befindet, würde jedoch das freigesetzte ACh sofort zu unwirksamen Konzentrationen verdünnt werden, so dass eine auto- oder parakrine ACh-Wirkung an den Deckzellen unwahrscheinlich scheint. Das OCT1-Protein wurde in der vorliegenden Arbeit in der gesamten Membran der murinen Intermediär- und Basalzellen nachgewiesen. Auch im humanen Darmepithel wurde OCT1 in der lateralen Membran der Enterozyten beschrieben, was eine beschleunigte Freisetzung von aufgenommenen Kationen möglich macht (Müller et al. 2005). In Enterozyten der Maus ist OCT1 basolateral lokalisiert (Chen et al. 2001) und es konnte durch KO-Studien eine basolaterale Kationen-Aufnahme in die Enterozyten gezeigt werden (Jonker et al. 2001, Jonker & Schinkel 2004). In der Harnblase ist ein ACh-Transport durch OCT1 zwischen Urothel und darunterliegender Lamina propria zwar möglich, aber nicht wahrscheinlich, da wir immunhistochemisch in der basalen Membran der Basalzellen nur eine schwache OCT1-Expression nachweisen konnten.

Eine OCT3-Immunreaktivität zeigt sich in der Membran von Intermediär- und Basalzellen, vor allem jedoch stark an der basalen Seite der Basalzellen (Abb. 4.1). Diese basale Lokalisation macht einen OCT3-vermittelten Austausch von ACh zwischen Basalzellen und darunter liegendem Gewebe wahrscheinlich. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine Studie an humaner Plazenta, wo mittels Western blot ebenfalls eine OCT3-Expression in der basolateralen Membran der Trophoblastenzellen gezeigt werden konnte. Hier wird ein möglicher OCT3-vermittelter Kationentransport von maternaler zu fetaler Seite und in entgegengesetzter Richtung beschrieben (Sata et al. 2005). Im Atemwegsepithel von Mensch und Ratte wurde OCT3 immunhistochemisch sowohl in der Basalzellmembran als auch luminal gefunden (Lips et al. 2005). Im Gegensatz zu dem basalen Vorkommen in Urothel und Plazenta wird in anderen Epithelien wie dem humanen Darmepithel eine luminale Expression von OCT3 beschrieben (Müller et al. 2005). Es wird vermutet,

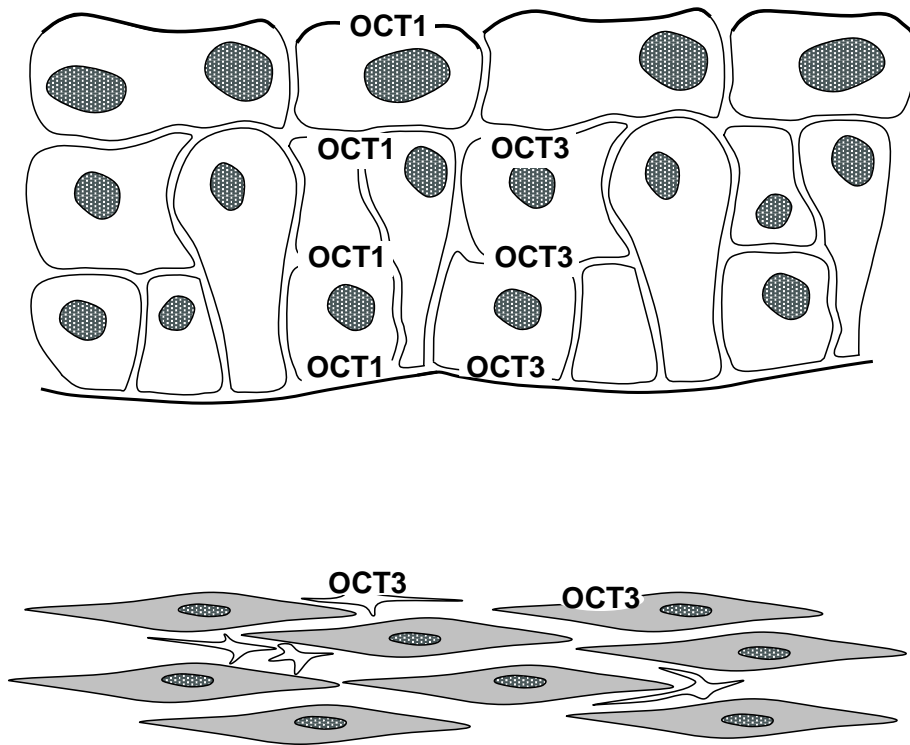


Abb. 4.1: Lokalisation von OCT1 und OCT3 in der Harnblase. Das OCT1-Protein ist in der apikalen Membran der Deckzellen und in der gesamten Membran der Intermediär- und Basalzellen lokalisiert. Das OCT3-Protein kommt ebenfalls in der gesamten Membran der Intermediär- und Basalzellen und insbesondere in der basalen Membran der Basalzellen vor. Im M. detrusor wird OCT3 von den Muskelzellen und außerdem von Zellen, die nach Größe und Form als Fibroblasten oder IC einzuordnen sind, exprimiert.

dass dieser Transporter in den Enterozyten für den ersten Schritt der Aufnahme von Kationen und umgekehrt für den letzten Schritt der Sekretion von Xenobiotika verantwortlich ist (Müller et al. 2005). Diese Funktion könnte man im Urothel dem apikal exprimierten OCT1, aber nicht dem basal lokalisierten OCT3 zuordnen.

In der Annahme, dass sowohl OCT1 als auch OCT3 in der Harnblase ACh transportieren, könnte in urothelialen Zellen produziertes ACh über OCT1 und OCT3 ins Interstitium der Mucosa freigesetzt werden und über den basal lokalisierten OCT3 in die Lamina propria transportiert werden (Abb. 4.2). In der Mucosa könnte das urotheliale ACh als autokrines Hormon an ACh-Rezeptoren binden, um die Freisetzung anderer Transmitter zu vermitteln oder um urotheliale Zellfunktionen zu modifizieren (de Groat 2006). In den darunter liegenden Schichten könnte das urotheliale ACh die Erregbarkeit cholinerg Nervenfasern beeinflussen (de Groat et al. 2004). Eine andere Möglichkeit ist die Aufnahme von ACh aus den VAcHT-haltigen cholinergen Nervenfasern der Lamina propria. Das exozytotisch freigesetzte ACh könnte erst über die basale Membran der Basalzellen mittels OCT3 ins Urothel transportiert werden, um dann durch OCT1 und OCT3 ins Interstitium der Mucosa zu gelangen (Abb. 4.2). Auch hier könnte das ACh in der Mucosa als autokrines Hormon die Transmitterfreisetzung oder Modifikation urothelialer Zellfunktionen vermitteln (de Groat 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden in der Tunica muscularis der Harnblase mittels Immunhistochemie zahlreiche VAcHT-immunreaktive Nervenfasern gefunden, was mit den Beobachtungen von Poladia & Bauer (2005) übereinstimmt. Wir konnten zeigen, dass die Muskelzellen selbst kein VAcHT besitzen, aber eine deutliche immunhistochemische OCT3-Markierung aufweisen. OCT3 wurde auch in den glatten Muskelzellen der humanen Bronchialarterien mittels RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen und es wurde mittels eines fluorometrischen Assay gezeigt, dass der Transporter hier für die Aufnahme von Noradrenalin verantwortlich ist (Horvath et al. 2003). In der Harnblase der Maus liegen außerdem in der Tunica muscularis OCT3-markierte Zellen, die aufgrund ihrer Lage und Form Fibroblasten oder IC (interstitielle Zellen) darstellen könnten. IC wurden im

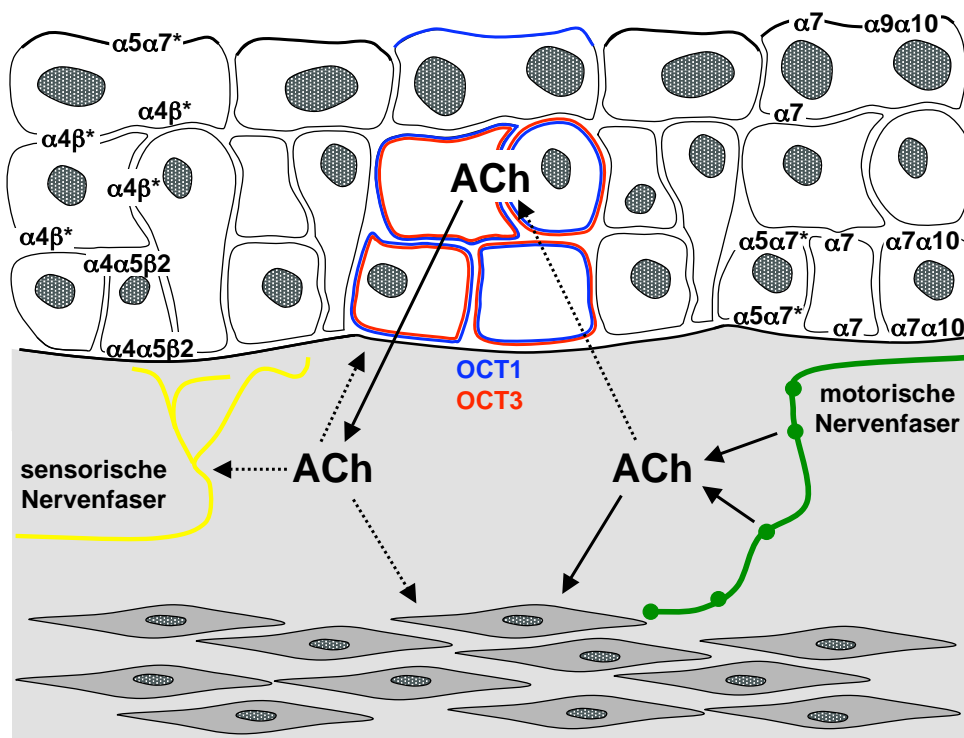


Abb. 4.2: Lokalisation und mögliche Funktion der organischen Kationentransporter (OCT) und der nikotinischen ACh-Rezeptoren im Urothel. Urotheliales ACh könnte durch OCT ins Interstitium der Mucosa und über die Basalmembran freigesetzt werden, wo es auf sensorische Nervenfasern der Lamina propria, auf das Urothel und auf die Tunica muscularis wirken könnte. Umgekehrt könnte das aus cholinergen Nervenfasern freigesetzte ACh nicht nur an Rezeptoren der Muskulatur binden, sondern auch über OCT ins Urothel aufgenommen werden.

M. detrusor des Meerschweinchens beschrieben (Gillespie et al. 2006). Da in der isolierten Harnblase eine phasische Kontraktion der Muskulatur zu beobachten ist, wird vermutet, dass IC an der Initiierung und Koordination der Muskelkontraktion beteiligt sind (Gillespie 2004, Gillespie et al. 2006).

In der murinen Harnblase stellt sich die Frage, ob durch eine OCT3-vermittelte ACh-Freisetzung in der Muskulatur selbst die Aktivität des M. detrusor beeinflusst werden kann. Dafür kommen insbesondere die stark OCT3-haltigen Fibroblasten oder IC, aber auch die Myozyten in Frage. Hiermit gäbe es auch in der Muskulatur zusätzlich zu den cholinergen (VAcHT-haltigen) Neuronen ein

Zellsystem, das ACh abhängig vom Konzentrationsgradienten aufnehmen oder abgeben kann. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in der murinen Lunge beschrieben, wo OCT3 in den glatten Muskelzellen die Bronchokonstriktion direkt beeinflusst (Kummer et al. 2006). Corticosteron ist ein Inhibitor aller drei OCT, wobei OCT3 die höchste Affinität aufweist (Koepsell et al. 2003). Da in der murinen Lunge OCT3 für den inhibitorischen Effekt von Corticosteron auf die Serotonin-induzierte Bronchokonstriktion verantwortlich ist (Kummer et al. 2006), kann auch in der Harnblasenmuskulatur eine Beeinflussung der OCT3-haltigen Myozyten oder Fibroblasten/IC durch Corticosteroide vermutet werden.

Mediatophor

In einigen non-neuronalen Zelllinien wie Fibroblasten, Gliomzellen und cerebralen Endothelzellen ist eine ACh-Freisetzung nachgewiesen worden, die durch das Mediatophor vermittelt werden soll (Malo & Israel 2003). Das Mediatophor setzt sich aus den fünf c-Untereinheiten der V-ATPase zusammen und kann ACh nur dann transportieren, wenn die Untereinheiten in die Zellmembran inseriert werden (Israel et al. 1986, Morel 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA der V-ATPase im abradierten Urothel nachgewiesen. Da allerdings mittels RT-PCR die subzelluläre Lokalisation der 15 kDa-Untereinheiten nicht möglich ist und die V-ATPase ein ubiquitär vorkommendes Enzym ist, kann im Urothel keine ausreichende Aussage über einen ACh-Transport durch das Mediatophor getroffen werden.

4.2.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

Das Urothel mehrerer Spezies ist sensibel für verschiedene Neurotransmitter. Es wurde im Urothel 1. ATP mittels Luciferin-Luciferase-Assay gemessen (Birder 2001), 2. eine Noradrenalin-vermittelte Freisetzung von NO (Birder et al. 2002b) und 3. eine ACh-vermittelte Freisetzung von ATP (Birder et al. 2003) nachgewiesen. In den Urothelzellen wurden Rezeptoren gefunden, die normalerweise in Neuronen vorkommen, z. B. Vanilloidrezeptoren (Birder et al. 2001), kalziumaktivierte

K⁺-Kanäle (Herrera et al. 2003) und nAChR (Beckel et al. 2006).

Die nAChR kommen in vielen epithelialen Geweben wie Haut (Grando et al. 1995), Atemwegen (Conti-Fine et al. 2000), Darm (Wessler et al. 1998), Harnblase (Beckel et al. 2006) und Plazenta (Lips et al. 2005) vor und scheinen für die Modulation zellulärer Signalwege verantwortlich zu sein (Sharma & Vijayaraghavan 2002). In humanen Keratinozyten, die ACh synthetisieren, freisetzen (Grando et al. 1993) und die nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ und $\beta 4$ exprimieren (Grando et al. 1995, 1996), wurde eine Regulation von Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Adhäsion und Beweglichkeit bereits beschrieben (Grando et al. 1995, Zia et al. 2000, Nguyen et al. 2003, Grando 2006). Diese Beeinflussung der Zellphysiologie durch nAChR scheint auch im Urothel möglich zu sein. Insbesondere die Bildung und Aufrechterhaltung einer effizienten Barriere zwischen Harn und Gewebe, ähnlich wie sie als Schutzbarriere der Haut beschrieben ist (Burkhart & Burkhart 2001), könnte eine der Hauptfunktionen der urothelialen nAChR sein. Tournier et al. zeigten in einer Studie zur Wundheilung des Bronchialepithels, dass sich die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 2$ in migrierenden Zellen anreichern, wogegen die Untereinheit $\alpha 7$ eher von ausdifferenzierten stationären Zellen exprimiert wird. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Wundheilung durch ACh und Nikotin gefördert und durch Inhibitoren der nAChR gehemmt wird (Tournier et al. 2006). Diese Beeinflussung der Wundheilung könnte auch im Urothel eine wichtige Funktion der nAChR darstellen. Da die verschiedenen Rezeptor-Subtypen in ihren physiologischen Eigenschaften und der Sensitivität auf pharmakologisch wirksame Substanzen variieren, ist eine genaue Kenntnis der einzelnen Untereinheiten von großer klinischer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit an der Harnblase der Maus wurden alle bisher bei Säugetieren bekannten α -Untereinheiten des nAChR ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$) untersucht und im Urothel mittels RT-PCR und Immunhistochemie die Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 4$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ nachgewiesen. Diese Ergebnisse stimmen nur zum Teil mit der Expression von nAChR im Urothel der Ratte überein. Hier wurden die nAChR-Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 5$ und $\alpha 7$ im Urothel untersucht und mittels RT-PCR eine

Expression von $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$, aber nicht von $\alpha 2$ und $\alpha 4$ festgestellt (Beckel et al. 2006). Über die Lokalisation der Untereinheiten im Urothel der Ratte stehen keine Informationen aus immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung. Die Verteilung der einzelnen Untereinheiten scheint zum Beispiel im Gehirn unterschiedlicher Spezies wie Mensch (Flora et al. 2000), Ratte (Boulter et al. 1990, Wada et al. 1990, Cimino et al. 1992) und Affe (Cimino et al. 1992) nicht identisch zu sein.

Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 6$ der α BTX-insensitiven nAChR

Die Untereinheit $\alpha 2$ wurde bisher nur in wenigen non-neuronalen Geweben nachgewiesen. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass die $\alpha 2$ -Untereinheit von humanen Monozyten, T- und B-Lymphozyten (Sato et al. 1999), glatter Gefäßmuskulatur der Ratte (Brüggmann et al. 2002) und Plazenta von Mensch und Ratte (Lips et al. 2005) exprimiert wird. Da in der vorliegenden Arbeit keine spezifischen Antikörper zum Nachweis des $\alpha 2$ -Proteins zur Verfügung standen, konnte im Urothel der murinen Harnblase nur die $\alpha 2$ -mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde im Urothel der Ratte mittels RT-PCR keine $\alpha 2$ -Expression gezeigt (Beckel et al. 2006).

Obwohl die $\alpha 3$ -Untereinheit in den Epithelien des humanen Gastrointestinaltrakt (Flora et al. 2000, Nguyen et al. 2000), der humanen Haut (Nguyen et al. 2004), des humanen Nasal- und Bronchialepithel (Zia et al. 1997, Keiger et al. 2003), der Plazenta von Mensch und Ratte (Lips et al. 2005) und dem Urothel der Ratte (Beckel et al. 2006) vorkommt, wurde die $\alpha 3$ -Untereinheit in der vorliegenden Arbeit weder mittels RT-PCR noch Immunhistochemie im Urothel der Maus gefunden. Auch in der humanen Harnblase konnte mittels RT-PCR keine $\alpha 3$ -mRNA nachgewiesen werden (Flora et al. 2000). $\alpha 3$ -KO-Mäuse, die 1999 generiert wurden, zeigen jedoch eine ungeklärte Letalität innerhalb der ersten Lebenswoche bei postnatalem Minderwuchs, Mydriasis und einer stark herabgesetzten Kontraktilität des M. detrusor, die zu Megazystis mit Harntröpfeln, Harnverhalt, Zystitis und Zystolithiasis führt (Xu et al. 1999). Hier stellt sich die Frage, warum die

KO-Mäuse an der Harnblase eine so ausgeprägte Symptomatik zeigen, obwohl die $\alpha 3$ -Untereinheit im Urothel nicht gefunden wurde. Eine mögliche Erklärung stellen die cholinergen Ganglien der Harnblasenmuskulatur dar, die eine starke $\alpha 3$ -Expression aufweisen. Diese ganglionäre Lokalisation der $\alpha 3$ -Untereinheit wurde in der vorliegenden Arbeit an der Harnblase der Maus und zuvor von Beckel et al. (2006) an der Harnblase der Ratte nachgewiesen. Ein Defizit der $\alpha 3$ -Untereinheit in den parasympathischen intramuralen Ganglien der Harnblase würde so bei den $\alpha 3$ -KO-Tieren den Verlust von innervationsabhängigen Kontraktionen der Muskulatur begründen. Auch eine Studie am Plexus submucosus im Ileum des Meerschweinchens beschreibt das Vorkommen der $\alpha 3$ -Untereinheit in den Ganglienzellen (Glushakov et al. 2004), über die die Darmperistaltik vermittelt wird. Nervenfasern im Diaphragma der Ratte besitzen präsynaptische $\alpha 3\beta 2$ -Rezeptoren, durch deren Aktivierung eine ACh-Freisetzung stattfindet (Faria et al. 2003). Diese $\alpha 3\beta 2$ -Rezeptoren (Wang et al. 1996, Zwart & Vijverberg et al. 1997) oder $\alpha 3\beta 3\beta 4$ -Rezeptoren (Forsayeth & Kobrin 1997) können auch in den Ganglien der Harnblase vorkommen. Da in Spinalganglien die Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 4$ mit $\alpha 3$ assoziiert sind (Del Signore et al. 2002, 2004) und in Studien an $\beta 4$ -KO-Mäusen eine Beteiligung der $\beta 4$ -Untereinheit an der ganglionäre Transmission in Herzen, Darm und Harnblase gezeigt wurde, wird in Ganglien die Existenz von $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren beschrieben (Wang et al. 2001, 2003). Auch in der murinen Harnblase kann deshalb eine Vermittlung der elektromechanischen Kopplung vor allem durch $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren vermutet werden.

Mittels RT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die $\alpha 4$ -Untereinheit im Urothel der murinen Harnblase exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wurde im Urothel der Ratte mittels RT-PCR keine $\alpha 4$ -Expression gefunden (Beckel et al. 2006). In der Maus kommt $\alpha 4$ -Protein in der Membran aller drei urothelialen Zellschichten und insbesondere im basalen Zytoplasma der Deckzellen vor. Eine ähnliche Beobachtung wurde im viszerale Dottersack der Ratte gemacht, in der die $\alpha 4$ -Untereinheit ebenfalls intrazellulär im basalen Teil der Epithelzellen lokalisiert ist (Lips et al. 2005). Die intrazelluläre Lokalisation der $\alpha 4$ -

Untereinheit in den murinen urothelialen Deckzellen kann auf einer Darstellung des Proteins während seines intrazellulären Synthese- und Prozessierungsweges beruhen, jedoch ist auch eine direkte zytoplasmatische Interaktion des $\alpha 4$ -haltigen Rezeptors mit ACh denkbar (Wessler et al. 1998, Lips et al. 2005). Da die $\alpha 4$ -Untereinheit Heteropentamere mit anderen Untereinheiten bildet, sind $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 4\beta 4$ -Rezeptoren (Zwart & Vijverberg 1997, Nelson et al. 2003) möglich. Da in der basalen Membran der Basalzellen auch die $\alpha 5$ -Untereinheit exprimiert wird, können hier außerdem $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ -Rezeptoren (Lukas et al. 1999) vorkommen.

In der Muskulatur der murinen Harnblase exprimieren sowohl die glatten Muskelzellen als auch die vegetativen Ganglien die $\alpha 4$ -Untereinheit. In der glatten Gefäßmuskulatur (Brüggmann et al. 2002), Herzmuskulatur (Dvorakova et al. 2005) und Skelettmuskulatur (Sala et al. 1996) wurde ebenfalls eine $\alpha 4$ -Expression festgestellt. Es wird vermutet, dass die nAChR in den non-neuronalen Anteilen der Muskulatur zahlreiche metabolische und trophische Funktionen ausüben (Gotti & Clementi 2004). Hierzu kommen in den Myozyten des M. detrusor verschiedene Rezeptortypen in Frage: $\alpha 4\beta 2$ (Ramirez-Latorre et al. 1996, Fenster et al. 1999, Nelson et al. 2003), $\alpha 4\beta 4$ (Zwart & Vijverberg et al. 1997) und $\alpha 4\beta 2\beta 3\beta 4$ (Forsayeth & Kobrin 1997). Da $\alpha 4$ -haltige Rezeptoren im ZNS eine wichtige Rolle spielen, liegt ihre Lokalisation in den Neuronen der vegetativen Ganglien nahe. Während wir in den intramuralen Ganglien der murinen Harnblase eine $\alpha 4$ -, aber keine $\alpha 5$ -Expression zeigen konnten, wurden in cholinergen Ganglien im Ileum des Meerschweinchens die $\alpha 5$ -, aber nicht die $\alpha 4$ -Untereinheit gefunden (Glushakov et al. 2004). Dies zeigt wiederum, dass die Verteilung der nAChR-Untereinheiten in verschiedenen Spezies und Geweben stark variiert. Die $\alpha 4$ -haltigen Ganglien der murinen Harnblase könnten mit β -Untereinheiten die bei den Muskelzellen genannten funktionellen Rezeptoren bilden ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 4\beta 2\beta 3\beta 4$) und die neuromuskuläre Erregungsübertragung vermitteln.

Die $\alpha 5$ -Untereinheit ist in non-neuronalen Geweben wie Keratinozyten (Grando et al. 1996), Thymus (Mihovilovic & Roses 1993), T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten (Mihovilovic et al. 1997, Sato et al. 1999), Gastrointestinaltrakt (Flora

et al. 2000), Bronchialepithel (Zia et al. 1997), Endothel (Abbruscato et al. 2002, Brüggmann et al. 2002), glatter Gefäßmuskulatur (Brüggmann et al. 2002) und Plazenta (Lips et al. 2005) weit verbreitet. In der Harnblase der Maus wird die $\alpha 5$ -Untereinheit in den basalen und apikalen Anteilen des Urothels exprimiert, wie die vorliegende Arbeit mittels RT-PCR und Immunhistochemie zeigt. Ebenso kommt $\alpha 5$ -mRNA im Urothel der Ratte vor, wie mittels RT-PCR nachgewiesen wurde (Beckel et al. 2006). An humaner Harnblase wurde ebenfalls eine $\alpha 5$ -Expression beschrieben, jedoch ist hier mittels Northern Blot das gesamte Organ untersucht worden, weswegen keine Aussage zum Urothel getroffen werden kann (Flora et al. 2000). Die $\alpha 5$ -Untereinheit kommt nur in Kombination mit mindestens zwei anderen α - oder β -Untereinheiten vor (Conroy et al. 1992, Groot-Kormelink et al. 1998, Lindstrom 2000). In den murinen Deckzellen, die die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 7$ in der apikalen Membran exprimieren, ist daher eine Zusammenstellung zu $\alpha 5\alpha 7\beta$ -Rezeptoren (Crabtree et al. 1997) möglich. Die Basalzellen zeigen immunhistochemisch eine ausgeprägte $\alpha 5$ -Markierung in der basalen Membran. Da die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 7$ ebenfalls in der Basalzellmembran vorkommen, könnten sich dort funktionelle $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ - oder $\alpha 5\alpha 7$ -haltige Rezeptoren (Crabtree et al. 1997, Lukas et al. 1999) bilden.

Die Funktion der $\alpha 5$ -Untereinheit scheint weniger in der direkten Bildung von Liganden-Bindungsstellen, sondern vielmehr in der Beeinflussung der Rezeptorphysiologie zu liegen: Die Kombination eines Rezeptors mit der $\alpha 5$ -Untereinheit erhöht die Erregbarkeit und Kalziumpermeabilität des Rezeptors und modifiziert seine Empfindlichkeit auf Agonisten (Ramirez-Latorre et al. 1996, Kuryatov et al. 1997, Gerzanich et al. 1998, Gotti & Clementi 2004). Eine Koexpression der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$, wie sie in neuronalen Zellen beschrieben ist, wurde auch in non-neuronalen Zellen wie Thymozyten, Zellen des Gastrointestinaltrakts (Flora et al. 2000), Bronchialepithelzellen (Maus et al. 1998) und Endothelzellen (Brüggmann et al. 2002) bestätigt. Da im Urothel der Maus jedoch keine $\alpha 3$ -Untereinheit gefunden wurde, kann hier nicht von einer Koexpression ausgegangen werden. Dies entspricht auch Beobachtungen in zahlreichen humanen

Geweben, z. B. dem kardiovaskulären und urogenitalen System einschließlich der Harnblase (Flora et al. 2000).

In der glatten Muskulatur der murinen Harnblase konnten wir immunhistochemisch eine $\alpha 5$ -Markierung nachweisen. In einer murinen Muskelzelllinie wurde ebenfalls eine Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit gezeigt (Campos-Caro et al. 2001). Da in der Harnblase der Maus die glatten Muskelzellen auch die $\alpha 7$ -Untereinheit exprimieren, könnten somit Rezeptoren aus den Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ die Zellphysiologie der Myozyten beeinflussen ($\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 5\alpha 7\beta$, Crabtree et al. 1997, Lukas et al. 1999). Obwohl in Ganglienzellen im Ileum des Meerschweinchens (Glushakov et al. 2004) die $\alpha 5$ -Untereinheit nachgewiesen wurde, konnten wir zeigen, dass in der murinen Harnblase weder den M. detrusor innervierende Nervenfasern noch autonome Ganglien $\alpha 5$ -immunreaktiv waren. Deshalb ist eine Kombination der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zu funktionellen Rezeptoren, wie sie in autonomen Ganglien anderer Organe beschrieben wurde (Conroy & Berg 1995), in der murinen Harnblase nicht anzunehmen.

$\alpha 5$ -KO-Mäuse zeigten mit Ausnahme der oben beschriebenen Auswirkungen des Gendefekts auf das ZNS bis ins Erwachsenenalter keine offensichtlichen phänotypischen Merkmale (Wang et al. 2002a, Salas et al. 2003). Allerdings scheint das Fehlen der $\alpha 5$ -Untereinheit eine Neigung zu experimentell erzeugten entzündlichen Darmerkrankungen zu verursachen (Orr-Urtreger et al. 2005). Im Urothel scheint die Funktion der $\alpha 5$ -Untereinheit aber durch andere Rezeptoruntereinheiten übernommen werden zu können.

Über die $\alpha 6$ -Untereinheit, die in einigen Regionen des ZNS eine wichtigen Rolle spielt, ist in non-neuronalen Zellen bisher wenig bekannt. Mittels RT-PCR wurde die Untereinheit $\alpha 6$ in der Plazenta von Mensch und Ratte (Lips et al. 2005), thorakaler und abdominaler Aorta der Ratte (Brüggmann et al. 2002) und humanen T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten (Sato et al. 1999) gezeigt. Im abradiierten Urothel der murinen Harnblase konnten wir ebenfalls mittels RT-PCR die $\alpha 6$ -mRNA nachweisen. Da keine spezifischen Antikörper für die immunhistochemische Darstellung des $\alpha 6$ -Proteins zur Verfügung standen, kann über

die Lokalisation in den einzelnen Schichten des Urothels und im M. detrusor bzw. den Nervenfasern keine Aussage getroffen werden. In den Regionen des Urothels, in denen die Untereinheiten $\alpha 4$ oder $\alpha 5$ vorkommen, könnten mit der $\alpha 6$ -Untereinheit einige komplexe Heteropentamere gebildet werden: $\alpha 5\alpha 6\beta 2$ (Kuryatov et al. 2000), $\alpha 4\alpha 5\alpha 6\beta 2$ (Klink et al. 2001) und $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ (Gotti et al. 2005).

Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ der α -BTX-sensitiven nAChR

Die Untereinheit $\alpha 7$ wurde in zahlreichen non-neuronalen Zellen wie humanen Monozyten, T- und B-Lymphozyten (Sato et al. 1999), Sehne und Periost (Romano et al. 1997a), Skelettmuskel (Corriveau et al. 1995, Romano et al. 1997b) und Gefäßendothel (Wang et al. 2001, Abbruscato et al. 2002, Brüggmann et al. 2002, Li & Wang 2006) gefunden. Auch Epithelien der Nasal- und Bronchialmukosa (Zia et al. 1997, Keiger et al. 2003), der Lunge (Sekhon et al. 1999), des oberen Verdauungstraktes (Nguyen et al. 2000), der Plazenta (Lips et al. 2005), der Haut (Zia et al. 2000, Nguyen et al. 2001) und der Harnblase (Beckel et al. 2006, Bschleipfer et al. 2007) exprimieren die $\alpha 7$ -Untereinheit.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels RT-PCR $\alpha 7$ -mRNA im Urothel der Maus nachgewiesen, was mit den Untersuchungen von Beckel et al. (2006) am Urothel der Ratte und von Bschleipfer et al. (2007) am Urothel des Menschen übereinstimmt. Immunhistochemisch ist das $\alpha 7$ -Protein im murinen Urothel in der Membran sowohl der Basal- als auch der Deckzellen lokalisiert. Dieses Expressionsmuster entspricht den Beobachtungen am Gingivaepithel, wo die $\alpha 7$ -Untereinheit immunhistochemisch ebenfalls in basalen und apikalen Zellschichten gefunden wurde (Nguyen et al. 2000). Da im murinen Urothel die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 7$ beide in der basalen und apikalen Zellschicht lokalisiert sind, können sowohl homomere $\alpha 7$ -Rezeptoren als auch Kombinationen dieser beiden Untereinheiten vorkommen. An humanen Endothelzellen wurde gezeigt, dass die Expression der $\alpha 7$ -Untereinheit durch die Agonisten Nikotin und Cholin signifikant gesteigert und durch die Antagonisten Mecamylamin und α -BTX gehemmt wird (Li & Wang 2006). Da durch α -BTX-Gabe eine bleibende Reduktion der intrazellulären

Kalziumkonzentration auch nach Ende der α -BTX-Stimulation nachgewiesen werden konnte, postulieren Li & Wang (2006) eine Regulation zellulärer Funktionen durch den α 7-haltigen Rezeptor als autokrinen Faktor. Cooke (2007) stellt weiterhin einen möglichen Zusammenhang zwischen α 7-haltigen nAChR und einer pathologischen Angiogenese mit der Entstehung von Tumoren und Arteriosklerose dar.

In der Harnblase ist es möglich, dass urotheliale nAChR aus verschiedenen Untereinheiten gegensätzliche Wirkungen vermitteln (Beckel et al. 2006). Im Urothel der Ratte beschreiben die Autoren eine Hemmung der Blasenreflexe durch die α 7-Untereinheit, da Cholin als α 7-spezifischer Agonist in vivo diese Inhibition auslöst. Rezeptoren, die die α 3-Untereinheit enthalten, wird eine exzitatorische Wirkung auf die Harnblase zugeschrieben, eventuell durch die Freisetzung eines Mediators wie ATP. Ein Grund für diese gegensätzlichen Wirkungsweisen könnte die urotheliale Steuerung der Blasenfüllung und Miktion sein. So würde eine Aktivierung der α 7-haltigen Rezeptoren die Füllung der Blase und eine Aktivierung der α 3-haltigen Rezeptoren die Entleerung der Blase vermitteln. Die von Beckel et al. (2006) postulierte wichtige Rolle von α 3-haltigen Rezeptoren kann allerdings nicht als spezieübergreifend angenommen werden, da im Urothel der Maus die α 3-Untereinheit nicht gefunden wurde, was in der vorliegenden Arbeit sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt wurde. In der Maus könnte die exzitatorische Komponente der Blasensteuerung durch andere Untereinheiten vermittelt werden.

Im M. detrusor der murinen Harnblase exprimieren die glatten Muskelzellen und die Ganglien die α 7-Untereinheit. Bei Untersuchungen der glatten Gefäßmuskulatur (Brüggmann et al. 2002, Dvorakova et al. 2005, Lips et al. 2005), Skelett- und Herzmuskulatur (Corriveau et al. 1995, Sala et al. 1996, Tsuneki et al. 2003, Dvorakova et al. 2005) und einer murinen Muskelzelllinie (Campos-Caro et al. 2001) wurde ebenfalls eine α 7-Expression festgestellt. Heteromere Rezeptoren aus den Untereinheiten α 5 und α 7, wie sie im Plexus submucosus im Ileum des Meerschweinchens beschrieben wurden (Glushakov et al. 2004), sind

in den intramural gelegenen Ganglien in der murinen Harnblase unwahrscheinlich, da die $\alpha 5$ -Untereinheit hier nicht exprimiert wird. Die $\alpha 7$ -Untereinheit kann entweder homomere $\alpha 7$ -Rezeptoren oder heteromere $\alpha 7\beta 2$ -, $\alpha 7\beta 3$ - oder $\alpha 3\alpha 7\beta$ -Rezeptoren (Yu & Role 1998, Palma et al. 1999, Khiroug et al. 2002) bilden. Bei Untersuchungen an $\alpha 7$ -KO-Mäusen wurden bisher keine Auffälligkeiten an der Harnblase festgestellt (Orr-Urtreger et al. 1997), was auf eine Kompensation der Funktion der $\alpha 7$ -Untereinheit durch andere Rezeptoruntereinheiten schließen lässt.

Im Urothel der Maus wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die $\alpha 9$ - als auch die $\alpha 10$ -Untereinheit mittels RT-PCR und Immunhistochemie gefunden, was auch den Beobachtungen von Bschleipfer et al. (2007) am humanen Urothel entspricht. Während im murinen Urothel die apikale Membran der Deckzellen die Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ enthielten, wurde in den Basalzellen nur die $\alpha 10$ -Untereinheit nachgewiesen. Die Koexpression beider Untereinheiten in den Deckzellen stimmt mit den Beobachtungen an den Haarzellen der Cochlea überein (Elgoyhen et al. 2001, Lustig et al. 2001). Auch in non-neuronalen Geweben wie humanen Lymphozyten (Lustig et al. 2001, Peng et al. 2004), Plazenta von Mensch und Ratte (Lips et al. 2005) und Keratinozyten (Nguyen et al. 2000) wurden sowohl die $\alpha 9$ - als auch die $\alpha 10$ -Untereinheit nachgewiesen. In Expressionsstudien an *Xenopus*-Oozyten wurde keine Expression von funktionellen $\alpha 10$ -Homomeren und nur eine schwache Expression von funktionellen reinen $\alpha 9$ -Rezeptoren, aber ein starker ACh-induzierter Stromfluss bei der Injektion beider Untereinheiten gemessen (Oliver et al. 2001). Die Schlussfolgerung der Autoren auf eine Bildung von $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptoren lässt auch in den Deckzellen des murinen Urothels die Existenz von $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptoren vermuten. Diese können an regulatorischen Vorgängen wie der Zelladhäsion beteiligt sein, wie sie bereits in Keratinozyten beschrieben wurde (Sgard et al. 2002).

In der Membran der Basalzellen wurde nur die $\alpha 10$ -Untereinheit, aber nicht die $\alpha 9$ -Untereinheit nachgewiesen. Da die $\alpha 10$ -Untereinheit keine homomeren Rezeptoren bilden kann und Koexpressionsstudien der Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 6$ und

$\beta 2$ - $\beta 4$ mit $\alpha 10$ nicht zu funktionellen Rezeptoren geführt haben (Elgohyen et al. 2001, Sgard et al. 2002), stellt sich die Frage, in welcher Form die $\alpha 10$ -Untereinheit in der Basalschicht an der Bildung von Rezeptoren beteiligt ist. Bisher noch nicht ausreichend untersucht ist die Kombination der Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 10$. Das Expressionsmuster der beiden Untereinheiten im Urothel - beide sind in der basalen und der apikalen Zellschicht lokalisiert - weist auf eine Bildung von funktionellen $\alpha 7\alpha 10$ -Rezeptoren hin. Brüggmann et al. (2002) beschreiben ebenfalls eine simultane Verteilung und mögliche Kombination der Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 10$ im arteriellen System der Ratte, wo die $\alpha 9$ -Untereinheit nicht exprimiert wird.

Im M. detrusor der murinen Harnblase konnten wir in den glatten Muskelzellen und den darin liegenden Nervenfasern immunhistochemisch eine $\alpha 10$ -Expression, aber meist keine $\alpha 9$ -Expression nachweisen. Brüggmann et al. (2002) beschreiben ebenfalls dieses Expressionsmuster in den glatten Muskelzellen der Arterien in der Ratte. In der murinen Harnblase kann auch hier wieder die Kombination der Untereinheiten $\alpha 10$ mit $\alpha 7$ vermutet werden, da beide im M. detrusor das gleiche Verteilungsmuster besitzen.

Kombinationen der α -Untereinheiten des nAChR in den einzelnen Schichten des Urothels

In der Ratte zeigten Beckel et al. (2006) mittels Kalzium-Imaging, dass die urothelialen Untereinheiten des nAChR funktionell aktive Rezeptoren bilden können. Entsprechend ergeben sich im Urothel der Maus aus der Lokalisation der Untereinheiten in den einzelnen urothelialen Zellschichten einige Kombinationsmöglichkeiten zu funktionell aktiven Rezeptoren. Jedem dieser Subtypen werden spezifische elektrophysiologische Eigenschaften zugeschrieben, die verschiedene Effekte in der Harnblase vermitteln können (Beckel et al. 2006).

In der apikalen Membran der murinen Deckzellen werden die Untereinheiten $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ exprimiert (Abb. 4.3). Da die $\alpha 5$ -Untereinheit nur in Kombination mit mindestens einer anderen α - und einer β -Untereinheit funktionelle Rezeptoren bildet (Conroy et al. 1992, Groot-Kormelink et al. 1998, Lindstrom

2000), können $\alpha 5 \alpha 7 \beta$ -Rezeptoren (Crabtree et al. 1997) gebildet werden. Außerdem können hier $\alpha 7$ -Homomere (Couturier et al. 1990, Seguela et al. 1993) und heteromere $\alpha 9 \alpha 10$ -Rezeptoren (Elgohyen et al. 2001, Sgard et al. 2002) vorkommen (Abb. 4.4). Im basalen Anteil der Deckzellen sind die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 7$ lokalisiert. An diesen Stellen sind $\alpha 4 \beta 2$ - oder $\alpha 4 \beta 4$ -Heteromere (Zwart & Vijverberg 1997, Nelson et al. 2003) und $\alpha 7$ -Homomere (Couturier et al. 1990, Seguela et al. 1993) möglich. In den Intermediärzellen wurde nur die $\alpha 4$ -Untereinheit nachgewiesen, so dass hier $\alpha 4 \beta 2$ - oder $\alpha 4 \beta 4$ -Rezeptoren (Zwart & Vijverberg 1997, Nelson et al. 2003) gebildet werden können (Abb. 4.3, 4.4). Die Basalzellen exprimieren die Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 10$ und - besonders ausgeprägt in der basalen Membran - $\alpha 5$ (Abb. 4.3). Somit können in dieser Zellschicht Kombinationen aus den Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 5$ ($\alpha 4 \alpha 5 \beta 2$ -Rezeptoren, Ramirez-Latorre et al. 1996, Lukas et al. 1999), aus den Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 7$ (Crabtree et al. 1997) und außerdem $\alpha 7$ -Homomere (Couturier et al. 1990, Seguela et al. 1993) vorkommen. Da die $\alpha 10$ -Untereinheit bisher nur in $\alpha 9 \alpha 10$ -Rezeptoren beschrieben wurde (Elgohyen et al. 2001, Sgard et al. 2002) und hier die $\alpha 9$ -Untereinheit nicht lokalisiert ist, werden $\alpha 7 \alpha 10$ -haltige Rezeptoren vermutet, für die allerdings keine Daten aus Expressionsstudien vorliegen (Abb. 4.4).

Zusammenfassend kann dargestellt werden, dass im Urothel der Maus ein breites Spektrum von Kombinationen der einzelnen Untereinheiten möglich ist. Um diese relativ große Anzahl von Rezeptor-Subtypen einzugrenzen, könnten in zukünftigen Studien die β -Untereinheiten auf Expression und Lokalisation untersucht werden und die bisher nicht erfolgte zelluläre Lokalisation der $\alpha 2$ - und $\alpha 6$ -Untereinheit nachgeholt werden. Außerdem könnten durch funktionelle Untersuchungen die Zusammenstellung der Untereinheiten zu aktiven Rezeptoren studiert werden. Erst dann wäre eine genaue Angabe der Subtypen möglich, die auch in vivo gemeinsam mit den mAChR die ACh-Wirkung auf das Urothel vermitteln.

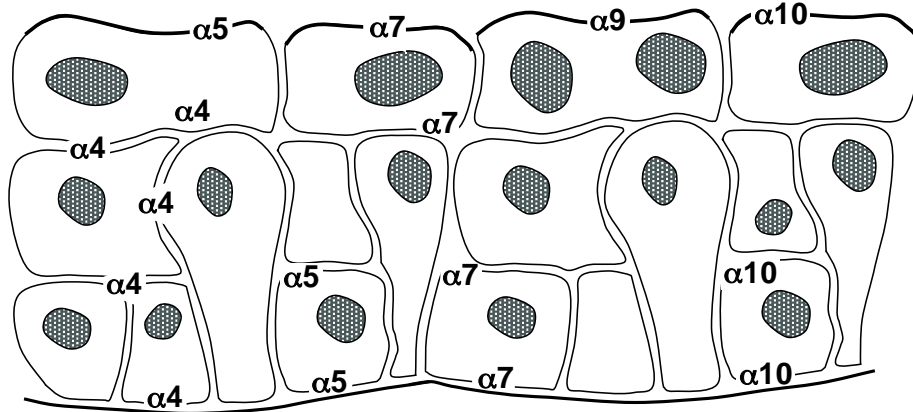


Abb. 4.3: Lokalisation der α -Untereinheiten des nAChR im Urothel. In der apikalen Membran der Deckzellen kommen die Untereinheiten $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$, in den basalen Anteilen die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 7$ vor. Die Intermediärzellen exprimieren die $\alpha 4$ -Untereinheit. In der Membran der Basalzellen sind die Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und $\alpha 10$ lokalisiert.

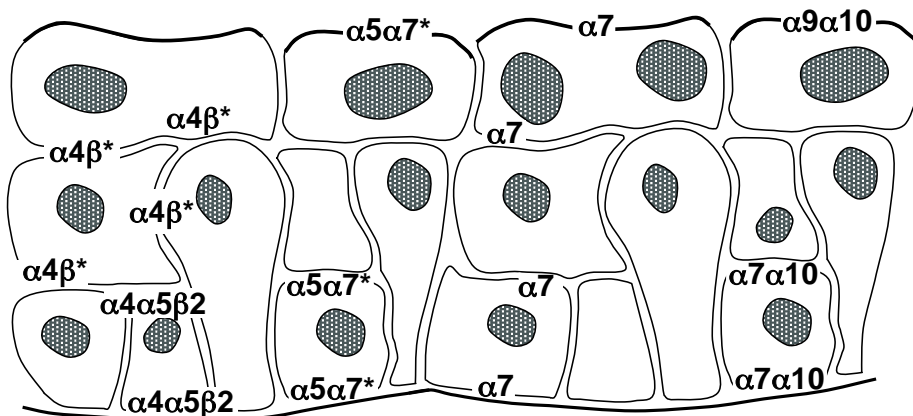


Abb. 4.4: Potenzielle funktionelle Rezeptoren aus den α -Untereinheiten des nAChR im Urothel. In der apikalen Membran der Deckzellen können $\alpha 5\alpha 7$ -haltige Rezeptoren ($\alpha 5\alpha 7^*$), $\alpha 7$ -Homomere und $\alpha 9\alpha 10$ -Heteromere, in den basalen Anteilen $\alpha 4\beta 2$ - oder $\alpha 4\beta 4$ -Heteromere ($\alpha 4\beta^*$) und $\alpha 7$ -Homomere gebildet werden. In den Intermediärzellen können $\alpha 4\beta 2$ - oder $\alpha 4\beta 4$ -Heteromere, in den Basalzellen $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ -Heteromere, $\alpha 5\alpha 7$ -haltige Rezeptoren, $\alpha 7$ -Homomere und eventuell $\alpha 7\alpha 10$ -haltige Rezeptoren vorkommen.

5 Zusammenfassung

Acetylcholin (ACh) ist in der Harnblase nicht nur der wichtigste, für die Miktion verantwortliche Neurotransmitter, sondern auch ein lokales Signalmolekül, das im Urothel der Harnblase, einem non-neuronalen Gewebe, nachgewiesen wurde. Vom Urothel freigesetztes ACh könnte ebenso wie intravesikal instillierte Anticholinergika an cholinerge Rezeptoren binden. Folglich ist es von großem Interesse, ob ACh aus dem Urothel freigesetzt werden und über autokrine/parakrine Mechanismen auf cholinerge Rezeptoren wirken kann. Bisher liegen keine Ergebnisse darüber vor, welche Komponenten des cholinergen Systems ACh im Urothel freisetzen. Muskarinische Rezeptoren wurden bereits untersucht, während nicht bekannt ist, ob im Urothel der Maus auch nikotinische Rezeptoren (nAChR) vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die möglichen Freisetzungsmechanismen von ACh (VACHT-vermittelte Exozytose, OCT, Mediatophor) und die ligandenbindenden α -Untereinheiten des nAChR im Urothel der Maus untersucht. Die verwendeten Methoden wurden an der neuronalen, cholinergen Neuroblastomzelllinie NS20Y etabliert. Vorkommen und subzelluläre Lokalisation von VACHT, OCT1-3, Mediatophor und den Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ des nAChR wurde im abradierten Urothel mittels RT-PCR und in der gesamten Harnblase mittels Immunhistochemie bestimmt. Im Urothel der Maus wurde weder VACHT-mRNA noch VACHT-Protein gefunden. In der Lamina propria wurden subepithelial gelegene, VACHT-immunreaktive Nervenfasern lokalisiert. Im abradierten Urothel konnte OCT1- und OCT3-mRNA nachgewiesen werden. Immunhistochemisch waren OCT1 und OCT3 in der Membran der Intermediär- und Basalzellen lokalisiert, wobei OCT1 auch in der apikalen Membran der Deckzellen vorkam. Die Spezifität der OCT1-Markierung wurde mittels einer OCT1/2-Doppel-KO-Maus

überprüft. Mit Ausnahme der $\alpha 3$ -Untereinheit exprimierten die Urothelzellen alle Untereinheiten des nAChR ($\alpha 2$, $\alpha 4$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$). In den Deckzellen wurden in der apikalen Membran die Untereinheiten $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$ und im basalen Anteil die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 7$ gefunden. In den Intermediärzellen war die $\alpha 4$ -Untereinheit, in den Basalzellen die Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und $\alpha 10$ lokalisiert.

Da jedem Subtyp der nAChR spezifische elektrophysiologische Eigenschaften zugeschrieben werden, ist die Kenntnis der einzelnen Untereinheiten von großer Bedeutung. Aufgrund der immunhistochemischen Lokalisation sind im Urothel der Maus folgende Kombinationen zu funktionellen Rezeptoren möglich: $\alpha 4\beta 2$ - oder $\alpha 4\beta 4$ -Heteromere, $\alpha 5\alpha 7$ -haltige Rezeptoren, $\alpha 7$ -Homomere und $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptoren in den Deckzellen, $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 4\beta 4$ -Heteromere in den Intermediärzellen und $\alpha 4\alpha 5$ -, $\alpha 5\alpha 7$ -, $\alpha 7\alpha 10$ -haltige Rezeptoren und $\alpha 7$ -Homomere in den Basalzellen. Die nAChR könnten im Urothel zur Bildung und Aufrechterhaltung einer effizienten Barriere zwischen Harn und Gewebe beitragen, die Regeneration stimulieren und die Blasenreflexe regulieren. Die Freisetzung von ACh im Urothel der Maus erfolgt nicht auf dem klassischen neuronalen Weg durch VACHT-vermittelte Exozytose. Da in vorangegangenen Arbeiten ein Transport von ACh durch OCT beschrieben wurde, kann im Urothel eine ACh-Freisetzung über OCT angenommen werden. Aufgrund der Lokalisation von OCT1 könnte ACh sowohl ins Lumen als auch in die Tunica mucosa freigesetzt werden. Da die OCT bidirektional transportieren können, wäre umgekehrt auch eine Aufnahme des neuronal freigesetzten ACh ins Urothel möglich. ACh könnte auf cholinerge Rezeptoren des Urothels und des M. detrusor wirken. Es ist sogar denkbar, dass es über sensorische Nervenfasern der Lamina propria die neuronale Erregbarkeit der Harnblase beeinflusst.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass im Urothel der Maus die Freisetzung von ACh nicht über den klassischen neuronalen Weg, sondern durch alternative Mechanismen erfolgt. Das freigesetzte ACh kann an eine Vielzahl nikotinischer Rezeptoren binden und dadurch verschiedenste zelluläre Signalwege modulieren. Diese Daten könnten als Basis für die Entwicklung neuer pharmakologischer Interventionsstrategien urologischer Erkrankungen dienen.

6 Summary

Acetylcholine (ACh) is not only the most important neurotransmitter of the urinary bladder responsible for miction but also a local signalling molecule found in the urothelium of the bladder, which is a non-neuronal tissue. ACh released by the urothelium may bind to cholinergic receptors, similar to intravesically instilled anticholinergics. Consequently, it is of great interest whether ACh can be synthesized and released by the urothelium itself and can act upon cholinergic receptors via autocrine/paracrine mechanisms. To date, there are no data which components of the cholinergic system release ACh in the urothelium. Muscarinic receptors have been investigated whereas it is unknown whether nicotinic receptors (nAChR) are also present in murine urothelium.

In the present thesis possible release mechanisms of ACh (VACHT-mediated exocytosis, OCT, mediatophore) and the ligand-binding α subunits of nAChR in the murine urothelium were investigated. The methods used were established using the neuronal cholinergic neuroblastoma cell line NS20Y. Presence and subcellular localization of VACHT, OCT1-3, mediatophore and subunits $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, and $\alpha 10$ were established in abraded urothelium by RT-PCR and in the entire urinary bladder by immunohistochemistry. In murine urothelium neither VACHT mRNA nor VACHT protein were found. In the lamina propria subepithelial VACHT immunolabelled nerve fibres were localized. In abraded urothelium OCT1 and OCT3 mRNA were detected. Immunohistochemistry showed a location of OCT1 and OCT3 in the membrane of the intermediate and basal cells, OCT1 also being present in the apical membrane of the umbrella cells. The specificity of the OCT1 immunolabelling was verified using an OCT1/2 double knockout mouse. All subunits of nAChR except the $\alpha 3$ subunit, i.e. subunits $\alpha 2$, $\alpha 4$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, were

expressed by the urothelium. In the umbrella cells, subunits $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, and $\alpha 10$ were found in the apical membrane, subunits $\alpha 4$ and $\alpha 7$ in the basal area. In the intermediate cells subunit $\alpha 4$, in the basal cells subunits $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, and $\alpha 10$ were localized.

Since specific electrophysiological properties are ascribed to each subtype of nAChR, the knowledge of the individual subunits is of great importance. According to immunohistochemical localization, the following assemblies into functional receptors must be considered: $\alpha 4\beta 2$ or $\alpha 4\beta 4$ heteromeres, $\alpha 5\alpha 7$ containing receptors, $\alpha 7$ homomeres, and $\alpha 9\alpha 10$ receptors in umbrella cells, $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 4\beta 4$ heteromeres in intermediate cells and $\alpha 4\alpha 5$, $\alpha 5\alpha 7$, $\alpha 7\alpha 10$ containing receptors and $\alpha 7$ homomeres in basal cells. The nAChR may contribute to the formation and maintenance of an efficient barrier between urine and tissue, stimulate regeneration and regulate bladder reflexes. In murine urothelium ACh is not released in the classical neuronal way via VAcHT-mediated exocytosis. Since in previous studies transportation of ACh by OCT has been described, a release of ACh by OCT in the murine urothelium may be assumed. The localization of OCT1 suggests a release of ACh into the lumen as well as into the tunica mucosa. In view of the bidirectionality of OCT, transportation of neuronally released ACh into the urothelium must also be considered. ACh might work on cholinergic receptors of the urothelium and of the m. detrusor. It is even conceivable that it affects the neuronal excitability of the urinary bladder via sensory nerve fibres in the lamina propria.

In conclusion, the present study demonstrates that ACh in the murine urothelium is not released in the classical neuronal way but by alternative mechanisms. The ACh released may bind to a multitude of nicotinic receptors and hence influence various cellular signalling pathways. These data might serve as the basis for the development of new pharmacological strategies for treatment of urological disorders.

7 Literaturverzeichnis

Abbruscato TJ, Lopez SP, Mark KS, Hawkins BT, Davis TP (2002) Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells. *J Pharm Sci* 91:2525-2538

Albuquerque EX, Alkondon M, Pereira EF, Castro NG, Schrattenholz A, Barbosa CT, Bonfante-Cabarcas R, Aracava Y, Eisenberg HM, Maelicke A (1997) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1117-1136

Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, Han HP, Rand JB (1993) The *caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 261:617-619

Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1396-1411

Amano T, Richelson E, Nirenberg M (1972) Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc Nat Acad Sci U S A* 69:258-263

Anderson DC, King SC, Parsons SM (1983) Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles. *Mol Pharmacol* 24:46-54

Andersson KE, Appell R, Awad S, Chapple C, Drutz H, Fourcroy J, Haab F, Wein A (2002) Pharmacological treatment of urinary incontinence. Abrams P, Khoury S, Wein A (eds): Incontinence. Second International Consultation on Incontinence. Plymbridge Distributors Ltd Plymouth (UK), 479-511

Andersson KE, Arner A (2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 84:935-986

Apodaca G (2004) The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 5:117-128

- Apparsundaram S, Ferguson SM, George AL, Blakely RD (2000) Molecular cloning of a human, hemicholinium-3 sensitive choline transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 276:862-867
- Arndt P, Volk C, Gorboulev V, Budiman T, Popp C, Ulzheimer-Teuber I, Akhoundova A, Koppatz S, Bamberg E, Nagel G, Koepsell H (2001) Interaction of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F454-F468
- Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Bercovich D, Orr-Urteger A, Kummer W, Lips K, Vetter DE, Grando SA (2002) Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J Cell Biol* 159:325-336
- Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B (1997) Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378:454-467
- Azam L, Winzer-Serhan UH, Chen Y, Leslie FM (2002) Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol* 444:260-74
- Balestra B, Vailati S, Moretti M, Hanke W, Clementi F, Gotti C (2000) Chick optic lobe contains a developmentally regulated alpha2alpha5beta2 nicotinic receptor subtype. *Mol Pharmacol* 58:300-311
- Beckel JM, Kanai A, Lee SJ, de Groat WC, Birder LA (2006) Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F103-110
- Beckel JM, Meyers S, Giesselman BR, de Groat WC, Birder LA (2005) Acetylcholine release from rat bladder epithelial cells and cholinergic modulation of bladder reflexes. *Exp Biol Abstracts* 863:2
- Bejanin S, Cervini R, Mallet J, Berrard S (1994) A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem* 269:21944-21947
- Benhammou K, Lee M, Strook M, Sullivan B, Logel J, Raschen K, Gotti C, Leonard S (2000) [(3)H]Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. *Neuropharmacology* 39:2818-2829
- Berger F, Gage FH, Vijayaraghavan S (1998) Nicotinic receptor-induced apoptotic cell

death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci* 18:6871-6881

Bertrand D, Changeux JP (1995) Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intracellular communication. *Seminars in the Neurosciences* 7:75-90

Biermann J, Lang D, Gorboulev V, Koepsell H, Sindic A, Schroter R, Zvirbliene A, Pavenstadt H, Schlatter E, Ciarimboli G (2006) Characterization of regulatory mechanisms and states of human organic cation transporter 2. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1521-1531

Birder LA, Apodaca G, de Groat WC, Kanai AJ (1998) Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder. *Am J Physiol* 275:F226-229

Birder LA, Barrick SR, Roppolo JR, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Buffington CA (2003) Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F423-429

Birder LA (2001) Involvement of the urinary bladder urothelium in signaling in the lower urinary tract. *Pro West Pharmacol Soc* 44:85-86

Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ (2001) Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13396-13401

Birder LA (2005) More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F489-495

Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, de Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ (2002a) Altered bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* 5:856-860

Birder LA, Nealen ML, Kiss S, de Groat WC, Caterina MJ, Wang E, Apodaca G, Kanai AJ (2002b) Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* 22:8063-8070

Birman S, Meunier FM, Lesbats B, Le Caer JP, Rossier J, Israel M (1990) A 15 kDa proteolipid found in mediatophore preparations from Torpedo electric organ presents high sequence homology with the bovine chromaffin granule protonophore. *FEBS Lett* 261:303-306

Bloc A, Bancila V, Israel M, Dunant Y (2000) Reconstitution of mediatophore-supported quantal acetylcholine release. *Metab Brain Dis* 15:1-16

- Bloom W, Fawcett DW (1975) A Textbook of Histology. 10th ed. Saunders Philadelphia London Toronto
- Boorman JP, Groot-Kormelink PJ, Sivilotti LG (2000) Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the $\beta 3$ subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 529:565-577
- Boulter J, OShea-Greenfield A, Duvoisin RM, Connolly JG, Wada E, Jensen A, Gardner PD, Ballivet M, Deneris ES, McKinnon D, Heinemann S, Patrick J (1990) Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J Biol Chem* 265:4472-4482
- Bravo DT, Kolmakova NG, Parsons SM (2004) Choline is transported by vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem* 91:766-768
- Breese CR, Adams C, Logel J, Drebing C, Rollins Y, Barnhart M, Sullivan B, Demasters BK, Freedman R, Leonard S (1997) Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ mRNA and [125I]-alpha-bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J Comp Neurol* 387:385-398
- Breuer C, Neuhuber WL, Wörl J (2004) Development of neuromuscular junctions in the mouse esophagus: morphology suggests a role for enteric coinnervation during maturation of vagal myoneural contacts. *J Comp Neurol* 475:47-69
- Brügmann D, Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W (2002) Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial system of the rat. *Histochem Cell Biol* 118:441-447
- Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Grando SA, Schwantes U, Kummer W, Lips KS (2007) Expression and distribution of cholinergic receptors in the human urothelium. *Life Sci* 80:2303-2307
- Buisson B, Picard F, Bertrand D (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from biophysical properties to human diseases. Clementi F, Gotti C, Fornasari D (eds): Neuronal nicotinic receptors. Springer Berlin Heidelberg New York, 272-299
- Burckhardt G, Wolff NA (2000) Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am Physiol Renal Physiol* 278:F853-866
- Burkhart CG, Burkhart CN (2001) The use of nicotine in dermatology revisited. *Int J Dermatol* 40:731-732
- Campos-Caro A, Carrasco-Serrano C, Valor LM, Ballesta JJ, Criado M (2001) Activity of

the nicotinic acetylcholine receptor alpha5 and alpha7 subunit promoters in muscle cells. *DNA Cell Biol* 20:657-666

Campos-Caro A, Smillie FI, Dominguez del Toro E, Rovira JC, Vicente-Agullo F, Chapuli J, Juiz JM, Sala S, Sala F, Ballesta JJ, Criado M (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem* 68:488-497

Carlisle DL, Liu X, Hopkins TM, Swick MC, Dhir R, Siegfried JM (2007) Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. *Pulm Pharmacol Ther* 20:629-41

Castro NG & Albuquerque EX (1995) alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* 68:516-524

Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290

Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux JP (2003) Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23:7820-7829

Champtiaux N, Han ZY, Bessis A, Rossi FM, Zoli M, Marubio L, McIntosh JM, Changeux JP (2002) Distribution and pharmacology of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci* 22:1208-1217

Chang A, Hammond TG, Sun TT, Zeidel ML (1994) Permeability properties of the mammalian bladder apical membrane. *Am J Physiol* 267:C1483-1492

Chan J, Quik M (1993) A role for the neuronal nicotinic alpha-bungarotoxin receptor in neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience* 56:441-451

Charpentier E, Wiesner A, Huh KH, Ogier R, Hoda JC, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D, Fuhrer C (2005) Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J Neurosci* 25:9836-9849

Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD (2001) Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* 21:6348-6361

- Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel J, Ford AP, de Groat WC, Birder LA (2005) Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* 562:859-871
- Ciarimboli G, Koepsell H, Iordanova M, Gorboulev V, Durner B, Lang D, Edemir B, Schroter R, Van Le T, Schlatter E (2005) Individual PKC-phosphorylation sites in organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation. *J Am Soc Nephrol* 16:1562-1570
- Ciarimboli G, Schlatter E (2005) Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch* 449:423-441
- Cimino M, Marini P, Fornasari D, Cattabeni F, Clementi F (1992) Distribution of nicotinic receptors in cynomolgus monkey brain and ganglia: localization of alpha 3 subunit mRNA, alpha-bungarotoxin and nicotine binding sites. *Neuroscience* 51:77-86
- Clarke PB (1993) Nicotinic receptors in mammalian brain: localization and relation to cholinergic innervation. *Prog Brain Res* 98:77-83
- Conroy WG, Berg DK (1995) Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem* 270:4424-4431
- Conroy WG, Berg DK (1998) Nicotinic receptor subtypes in the developing chick brain: appearance of a species containing the alpha4, alpha2, and alpha5 gene products. *Mol Pharmacol* 53:392-401
- Conroy DM, Francischi JN, Sirois P (1995) Effect of tumor necrosis factor receptor binding protein on cell infiltration induced by lipopolysaccharide and Sephadex beads in guinea pig lung. *Inflammation* 19:233-243
- Conroy WG, Vernallis AB, Berg DK (1992) The alpha 5 gene product assembles with multiple acetylcholine receptor subunits to form distinctive receptor subtypes in brain. *Neuron* 9:679-691
- Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD (2000) Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol* 393:279-294
- Cooke JP (2007) Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci* 80:2347-2351
- Cooper E, Couturier S, Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350:235-238

- Corriveau RA, Romano SJ, Conroy WG, Oliva L, Berg DK (1995) Expression of neuronal acetylcholine receptor genes in vertebrate skeletal muscle during development. *J Neurosci* 15:1372-1383
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M (1990) A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5:847-856
- Crabtree G, Ramirez-Latorre J, Role LW (1997) Assembly and Ca^{2+} regulation of neuronal nicotinic receptors including the alpha7 and alpha5 subunits. *Soc Neurosci Abstr* 23:391
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317-324
- Dani JA (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49:166-174
- Dan Y, Poo MM (1992) Quantal transmitter secretion from myocytes loaded with acetylcholine. *Nature* 359:733-736
- Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, Ordonez-Ercan D, Morris M, Haura E, Chellappan S (2006) Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J Clin Invest* 116:2208-2217
- Davies AR, Hardick DJ, Blagbrough IS, Potter BV, Wolstenholme AJ, Wonnacott S (1999) Characterisation of the binding of [3H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 38:679-690
- de Groat WC, Booth AM (1993) Synaptic transmission in pelvic ganglia. Maggi CA (ed): *The autonomic nervous system Vol 3. Nervous control of the urogenital system*. Harwood Academic Publishers London, 227-289
- de Groat WC, Giesselman B, Sun L, Humphrey AL (2004) Role of urothelial muscarinic receptors in the control of voiding in rats. *Soc Neurosci Abstract Viewer* 950:19
- de Groat WC (2006) Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol* 147:S25-S40
- Del Signore A, Gotti C, De Stefano ME, Moretti M, Paggi P (2002) Dystrophin stabilizes alpha 3- but not alpha 7-containing nicotinic acetylcholine receptor subtypes at the post-synaptic apparatus in the mouse superior cervical ganglion. *Neurobiol Dis* 10:54-66

- Del Signore A, Gotti C, Rizzo A, Moretti M, Paggi P (2004) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in the rat sympathetic ganglion: pharmacological characterization, subcellular distribution and effect of pre- and postganglionic nerve crush. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:138-150
- Drenckhahn D (2003a) Epithelgewebe. Drenckhahn D (Hrsg) Benninghoff A. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 16. Auflage. Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Urban & Fischer München Jena, 94-100
- Drenckhahn D (2003b) Muskelgewebe. Drenckhahn D (Hrsg) Benninghoff A. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 16. Auflage. Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Urban & Fischer München Jena, 149-170
- Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM (2001) Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci* 90:397-421
- Dresser MJ, Zhang L, Giacomini KM (1999) Molecular and functional characteristics of cloned human organic cation transporters. *Pharm Biotechnol* 12:441-469
- Duga S, Solda G, Asselta R, Bonati MT, Dalpra L, Malcovati M, Tenchini ML (2001) Characterization of the genomic structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster and identification of novel intragenic polymorphisms. *J Hum Genet* 46:640-648
- Duncan G, Collison DJ (2003) Role of the non-neuronal cholinergic system in the eye: a review. *Life Sci* 72:2013-2019
- Dvorakova M, Lips KS, Brüggmann D, Slavikova J, Kuncova J, Kummer W (2005) Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the rat heart. *Cell Tissue Res* 319:201-209
- Eiden LE, Schäfer MK, Weihe E, Schutz B (2004) The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 447:636-640
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlea hair cells.

Cell 79:705-715

Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J (2001) $\alpha 10$: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-3506

Eng CM, Kozak CA, Beaudet AL, Zoghbi HY (1991) Mapping of multiple subunits of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor to chromosome 15 in man and chromosome 9 in mouse. *Genomics* 9:278-282

Eraly SA, Monte JC, Nigam SK (2004) Novel slc22 transporter homologs in fly, worm, and human clarify the phylogeny of organic anion and cation transporters. *Physiol Genomics* 18:12-24

Erickson JD, Varoqui H, Schäfer M, Diebler MF, Weihe E, Modi W, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin T (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a „cholinergic“ gene locus. *J Biol Chem* 269:21929-21932

Falk-Vairant J, Israel M, Bruner J, Stinnakre J, Meunier FM, Gaultier P, Meunier F, Lesbats B, Synguelakis M, Correges P, Dunant Y (1996) Enhancement of quantal transmitter release and mediatophore expression by cyclic AMP in fibroblasts loaded with acetylcholine. *Neuroscience* 75:353-360

Faria M, Oliveira L, Timoteo MA, Lobo MG, Correia-De-Sa P (2003) Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing $\alpha 3 \beta 2$ subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. *Synapse* 49:77-88

Farsund T (1977) Cell Kinetics of mouse urinary bladder epithelium. *Virchows Arch B Cell Pathol* 25:179-89

Fenster CP, Whitworth TL, Sheffield EB, Quick MW, Lester RA (1999) Upregulation of surface $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J Neurosci* 19:4804-4814

Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ (1997) ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes - a possible sensory mechanism? *J Physiol* 505:503-511

Ferguson SM, Blakely RD (2004) The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Mol Interv* 4:22-37

Ferguson SM, Savchenko V, Apparsundaram S, Zwick M, Wright J, Heilman CJ, Yi H, Levey AI, Blakely RD (2003) Vesicular localization and activity-dependent trafficking of

presynaptic choline transporters. *J Neurosci* 23:9697-9709

Ferreira LT, Santos MS, Kolmakova NG, Koenen J, Barbosa J jr., Gomez MV, Guatimosim C, Zhang X, Parsons SM, Prado VF, Prado MA (2005) Structural requirements for steady-state localization of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem* 94:957-969

Fetscher C, Fleischman M, Schmidt M, Kregge S, Michel MC (2002) M(3) muscarinic receptors mediate contraction of human urinary bladder. *Br J Pharmacol* 136:641-643

Flora A, Schulz R, Benfante R, Battaglioli E, Terzano S, Clementi F, Fornasari D (2000) Transcriptional regulation of the human alpha5 nicotinic receptor subunit gene in neuronal and non-neuronal tissues. *Eur J Pharmacol* 393:85-95

Forsayeth JR, Kobrin E (1997) Formation of oligomers containing the beta3 and beta4 subunits of the rat nicotinic receptor. *J Neurosci* 17:1531-1538

Franceschini D, Paylor R, Broide R, Salas R, Bassetto L, Gotti C, De Biasi M (2002) Absence of alpha7-containing neuronal nicotinic acetylcholine receptors does not prevent nicotine-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 98:29-40

Fucile S, Matter JM, Erkman L, Ragozzino D, Barabino B, Grassi F, Alema S, Ballivet M, Eusebi F (1998) The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells. *Eur J Neurosci* 10:172-178

Fucile S, Renzi M, Lax P, Eusebi F (2003) Fractional Ca^{2+} current through human neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 34:205-209

Fujii T, Okuda T, Haga T, Kawashima K (2003) Detection of the high-affinity choline transporter in the MOLT-3 human leukemic T-cell line. *Life Sci* 72:2131-2134

Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K (2008) Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci* 106:186-192

Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, Kawashima K (1996) Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44:66-72

Gahring LC, Rogers SW (2006) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* 7:E885-894

Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R, Lindstrom J (1997) ‘Orphan’ alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 51:320-

327

Gerzanich V, Wang F, Kuryatov A, Lindstrom J (1998) alpha 5 subunit alters desensitization, pharmacology, Ca⁺⁺ permeability and Ca⁺⁺ modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 286:311-320

Gillespie JI, Markerink-van Ittersum M, De Vente J (2006) Endogenous nitric oxide/cGMP signalling in the guinea pig bladder: evidence for distinct populations of sub-urothelial interstitial cells. *Cell Tissue Res* 325:325-332

Gillespie JI (2004) Modulation of autonomous contractile activity in the isolated whole bladder of the guinea pig. *BJU Int* 93:393-400

Gilmor ML, Nash NR, Roghani A, Edwards RH, Yi H, Hersch SM, Levey AI (1996) Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *J Neurosci* 16:2179-2190

Glushakov AV, Voytenko LP, Skok MV, Skok V (2004) Distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing different alpha-subunits in the submucosal plexus of the guinea-pig. *Auton Neurosci* 110:19-26

Gorboulev V, Shatskaya N, Volk C, Koepsell H (2005) Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Mol Pharmacol* 67:1612-1619

Gotti C, Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74:363-396

Gotti C, Moretti M, Clementi F, Riganti L, McIntosh JM, Collins AC, Marks MJ, Whiteaker P (2005) Expression of nigrostriatal alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors is selectively reduced, but not eliminated, by beta 3 subunit gene deletion. *Mol Pharmacol* 67:2007-2015

Grando SA (1997) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2:41-48

Grando SA (2006) Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* 15:265-282

Grando SA, Horton RM, Mauro TM, Kist DA, Lee TX, Dahl MV (1996) Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol* 107:412-418

Grando SA, Horton RM, Pereira EF, Diethelm-Okita BM, George PM, Albuquerque EX,

- Conti-Fine BM (1995) A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 105:774-781
- Grando SA, Kist DA, Qi M, Dahl MV (1993) Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol* 101:32-36
- Green RM, Lo K, Sterritt C, Beier DR (1999) Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter. *Hepatology* 29:1556-1562
- Green WN, Millar NS (1995) Ion-channel assembly. *Trends Neurosci* 18:280-287
- Groot-Kormelink PJ, Luyten WH, Colquhoun D, Sivilotti LG (1998) A reporter mutation approach shows incorporation of the „orphan“ subunit beta3 into a functional nicotinic receptor. *J Biol Chem* 273:15317-15320
- Groves CE, Suhre WB, Cherrington NJ, Wright SH (2006) Sex differences in the mRNA, protein, and functional expression of organic anion transporter (Oat) 1, Oat3, and organic cation transporter (Oct) 2 in rabbit renal proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 316:743-752
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372:549-552
- Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E (1998) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* 1:349-351
- Haag C, Berkels R, Gründemann D, Lazar A, Taubert D, Schömig E (2004) The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain. *J Neurochem* 88:291-297
- Haberberger RV, Bodenbenner M (2000) Immunohistochemical localization of muscarinic receptors (M2) in the rat skin. *Cell Tissue Res* 300:389-396
- Haberberger RV, Bodenbenner M, Kummer W (2000) Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 113:379-387
- Haberberger RV, Pfeil U, Lips KS, Kummer W (2002) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol* 119:943-948
- Haga T, Noda H (1973) Choline uptake systems of rat brain synaptosomes, *Biochim Biophys Acta* 291:564-575
- Hahm SH, Chen L, Patel C, Erickson J, Bonner TI, Weihe E, Schafer MK, Eiden LE (1997)

Upstream sequencing and functional characterization of the human cholinergic gene locus. *J Mol Neurosci* 9:223-236

Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, de Groat WC, Birder LA (2007) Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 80:2298-2302

Hauschka TS, Kvedar BJ, Grinnell ST, Amos DB (1956) Immunoselection of polyploids from predominantly diploid cell populations. *Ann NY Acad Sci* 63:683-705

Hawthorn MH, Chapple CR, Cock M, Chess-Williams R (2000) Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro. *Br J Pharmacol* 129:416-419

Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* 136:829-836

Hegde SS, Eglen RM (1999) Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci* 64:419-428

Herrera GM, Pozo MJ, Zvara P, Petkov GV, Bond CT, Adelman JP, Nelson MT (2003) Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel. *J Physiol* 551:893-903

Hicks RM (1965) The fine structure of transitional epithelium of the rat ureter. *J Cell Biol* 26:25-48

Horvath G, Sutto Z, Torbati A, Conner GE, Salathe M, Wanner A (2003) Norepinephrine transport by the extraneuronal monoamine transporter in human bronchial arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L829-837

Ichikawa T, Ajiki K, Matsuura J, Misawa H (1997) Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry. *J Chem Neuroanat* 13:23-39

Ishii K, Wong JK, Sumikawa K (2005) Comparison of alpha2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression in the central nervous system of rats and mice. *J Comp Neurol* 493:241-260

Israel M, Dunant Y, Manaranche R (1979) The present status of the vesicular hypothesis. *Prog Neurobiol* 13:237-275

- Israel M, Lesbats B (1981) Continuous determination by a chemiluminescent method of acetylcholine release and compartmentation in Torpedo electric organ synaptosomes. *J Neurochem* 37:1475-1483
- Israel M, Lesbats B, Synguelakis M, Joliot A (1994) Acetylcholine accumulation and release by hybrid NG108-15, glioma and neuroblastoma cells - role of a 16kDA membrane protein in release. *Neurochem Int* 25:103-109
- Israel M, Morel N, Lesbats B, Birman S, Manaranche R (1986) Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9226-9230
- Jonker JW, Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the poly-specific organic cation transporters: OCT1, 2 and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 308:2-9
- Jonker JW, Wagenaar E, Mol CA, Buitelaar M, Koepsell H, Smit JW, Schinkel AH (2001) Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene. *Mol Cell Biol* 21:5471-5477
- Jonker JW, Wagenaar E, Van Eijl S, Schinkel AH (2003) Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes the renal secretion of organic cations. *Mol Cell Biol* 23:7902-7908
- Kaewmokul S, Chatsudthipong V, Evans KK, Dantzler WH, Wright SH (2003) Functional mapping of rbOCT1 and rbOCT2 activity in the S2 segment of rabbit proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F1149-1159
- Kaleczyc J, Wasowicz K, Klimczuk M, Czaja K, Lakomy M (2003) Immunohistochemical characterisation of cholinergic neurons in the anterior pelvic ganglion of the male pig. *Folia Histochem Cytobiol* 41(2):65-72
- Kawashima K, Fujii T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86:29-48
- Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci* 72:2101-2109
- Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H (2007) Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci* 80:2314-2319

- Kedmi M, Beaudet AL, Orr-Urtreger A (2004) Mice lacking neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4-subunit and mice lacking both alpha5- and beta4-subunits are highly resistant to nicotine-induced seizures. *Physiol Genomics* 17:221-229
- Keiger CJ, Prevette D, Conroy WG, Oppenheim RW (2003) Developmental expression of nicotinic receptors in the chick and human spinal cord. *J Comp Neurol* 455:86-99
- Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei Y, Leibach FH, Ganapathy V (1998) Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 273:15971-15979
- Ketterer B, Hicks RM, Christodoulides L, Beale D (1973) Studies of the chemistry of the luminal plasma membrane of rat epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 311:180-190
- Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL (2002) Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540:425-434
- Kim MH, Lu M, Lim EJ, Chai YG, Hersh LB (1999) Mutational analysis of aspartate residues in the transmembrane regions and cytoplasmatic loops of rat vesicular acetylcholine transporter. *J Biol Chem* 274:673-680
- Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Unger RE, Kriegsmann J, Kilbinger H, Wessler I (2001) The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol* 85:24-28
- Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Höhle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:515-523
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP (2001) Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452-1463
- Koelle GB (1950) The histochemical differentiation of types of cholinesterases and their localizations in tissue of the cat. *J Pharmacol Exp Ther* 100:158-179
- Koepsell H, Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 447:666-676
- Koepsell H (1998) Organic cation transporters in intestine, kidney, liver and brain. *Annu Rev Physiol* 60:243-266

- Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V (2003) Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150:36-90
- Koss LG (1969) The asymmetric unit membranes of the epithelium of the urinary bladder of the rat. *Lab Invest* 21:154-68
- Krantz DE, Waites C, Oorschot V, Liu Y, Wilson RI, Tan PK, Klumperman J, Edwards RH (2000) A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine transporter to dense core vesicles. *J Cell Biol* 149:379-396
- Kriz W (2003) Harnwege. Drenckhahn D (Hrsg) Benninghoff A. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 16. Auflage. Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Urban & Fischer München Jena, 791-798
- Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS (2006) Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respir Res* 7:65
- Kuryatov A, Gerzanich V, Nelson M, Olale F, Lindstrom J (1997) Mutation causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy alters Ca²⁺ permeability, conductance, and gating of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 17:9035-9047
- Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Choi C, Lindstrom J (2000) Human $\alpha 6$ AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharmacology* 39:2570-2590
- Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA (2007) The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39:125-135
- Lai A, Parameswaran N, Khwaja M, Whiteaker P, Lindstrom JM, Fan H, McIntosh JM, Grady SR, Quik M (2005) Long-term nicotine treatment decreases striatal $\alpha 6^*$ nicotinic acetylcholine receptor sites and function in mice. *Mol Pharmacol* 67:1639-1647
- Langley JN (1907) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of „receptive“ substances: Part I. *J Physiol* 36:347-384
- Lee CY, Chang CC, Chen YM (1972) Reversibility of neuromuscular blockade by neurotoxins from elapid and sea snake venoms. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* 71:344-349
- Le Novère N, Zoli M, Changeux JP (1996) Neuronal nicotinic receptor $\alpha 6$ subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci* 8:2428-2439

- Leroy C, Meunier FM, Lesbats B, Israel M (1994) In vitro expression of the 15 kDa subunit of the mediatophore and functional reconstitution of acetylcholine release. *Gen Pharmacol* 25:245-255
- Lewis SA (2000) Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F867-874
- Lindstrom J (2000) The structures of neuronal nicotinic receptors. Clementi F, Fornasari D, Gotti C (eds) *Neuronal Nicotinic Receptors. Handbook of Experimental Pharmacology series Vol 144*. Springer Berlin Heidelberg New York, 101-162
- Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G (1996) Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res* 109:125-137
- Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W (2002) Localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit. *Cell Tissue Res* 307:275-280
- Lips KS, Pfeil U, Reiners K, Rimasch C, Kuchelmeister K, Braun-Dullaeus RC, Haberberger RV, Schmidt R, Kummer W (2003) Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries. *J Histochem Cytochem* 51:1645-1654
- Lips KS, Volk C, Schmidt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Emert L, Kummer W, Koepsell H (2005) Polyspecific organic cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:79-88
- Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Wessler I, Schwantes U, Koepsell H, Kummer W (2007) Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51:1042-1053
- Liu Y, Edwards RH (1997) Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporter in PC12 cells but non CHO cells. *J Cell Biol* 139:907-916
- Li XW, Wang H (2006) Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization. *Life Sci* 78:1863-1870
- Loewi O, Navratil E (1926) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoff. *Pflügers Arch* 214:678-688
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiapinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonacott S (1999) International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51:397-401

- Lustig LR (2006) Nicotinic acetylcholine receptor structure and function in the efferent auditory system. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288:424-434
- Lustig LR, Peng H, Hiel H, Yamamoto T, Fuchs PA (2001) Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics* 73:272-283
- Macklin KD, Maus AD, Pereira EF, Albuquerque EX, Conti-Fine BM (1998) Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 287:435-439
- Malo M, Israel M (2003) Expression of the acetylcholine release mechanism in various cells and reconstruction of the release mechanism in non-releasing cells. *Life Sci* 72:2029-2038
- Mamalaki A, Tzartos SJ (1994) Nicotinic acetylcholine receptor: structure, function and main immunogenic region. *Adv Neuroimmunol* 4:339-354
- Marshall IG, Parsons SM (1987) The vesicular acetylcholine transport system. *Trends Neurosci* 10:174-177
- Marubio LM, Changeux J (2000) Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function. *Eur J Pharmacol* 393:113-121
- Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez M, Cordero-Erausquin M, Lena C, Le Novere N, de Kerchove d'Exaerde A, Huchet M, Damaj MI, Changeux JP (1999) Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 398:805-810
- Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, Cortes WS, Albuquerque EX, Conti-Fine BM (1998) Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 54:779-788
- May BJ, Prosen CA, Weiss D, Vetter D (2002) Behavioral investigation of some possible effects of the central olivocochlear pathways in transgenic mice. *Hear Res* 171:142-157
- Mayerhofer A, Fritz S (2002) Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc Res Tech* 59:503-508
- McGehee DS, Role LW (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol* 57:521-546
- Mehrens T, Lelleck S, Cetinkaya I, Knollmann M, Hohage H, Gorboulev V, Boknik P, Koepsell H, Schlatter E (2000) The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* 11:1216-1224
- Merickel A, Kaback HR, Edwards RH (1997) Charged residues in transmembrane domains

II and XI of a vesicular monoamine transporter form a charge pair that promotes high affinity substrate recognition. *J Biol Chem* 272:5403-5408

Merickel A, Rosandich P, Peter D, Edwards RH (1995) Identification of residues involved in substrate recognition by a vesicular monoamine transporter. *J Biol Chem* 270:25798-25804

Metzen J, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H, Wessler I (2003) Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype. *Life Sci* 72:2075-2080

Meyer-Wentrup F, Karbach U, Gorboulev V, Arndt P, Koepsell H (1998) Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 248:673-678

Mihovilovic M, Denning S, Mai Y, Whichard LP, Patel DD, Roses AD (1997) Thymocytes and cultured thymic epithelial cells express transcripts encoding alpha-3, alpha-5 and beta-4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: preferential transcription of the alpha-3 and beta-4 genes by immature CD4 + 8 + thymocytes. *J Neuroimmunol* 79:176-184

Mihovilovic M, Roses AD (1993) Expression of alpha-3, alpha-5, and beta-4 neuronal acetylcholine receptor subunit transcripts in normal and myasthenia gravis thymus. Identification of thymocytes expressing the alpha-3 transcripts. *J Immunol* 151:6517-6524

Misawa H, Takahashi R, Deguchi T (1995) Coordinate expression of vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic superior cervical neurones. *Neuroreport* 6:965-968

Mishina M, Kurosaki T, Tobimatsu T, Morimoto Y, Noda M, Yamamoto T, Terao M, Lindstrom J, Takahashi T, Kuno M, Numa S (1984) Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs *Nature* 307:604-608

Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321:406-411

Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW (1992) Cytokeratin 20 in human carcinomas: a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 140: 427-447

Mooslehner KA, Allen ND (1999) Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, *Slc22a2*, from an enhancer-trap transgene integration locus. *Mamm Genome* 10:218-224

Morel N (2003) Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H⁺ATPase. *Biol Cell* 95:453-457

- Moretti M, Vailati S, Zoli M, Lippi G, Riganti L, Longhi R, Viegi A, Clementi F, Gotti C (2004) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes expression during rat retina development and their regulation by visual experience. *Mol Pharmacol* 66:85-96
- Morris D (1966) The choline acetyltransferase of human placenta. *Biochem J* 98:754-762
- Morrison J, Birder L, Craggs M, de Groat WC, Downie J, Drake M, Fowler C, Thor K (2005) Neural control. Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A (eds) *Incontinence*. Health Publications Ltd, Jersey, 363-422
- Müller J, Lips KS, Metzner L, Neubert RH, Koepsell H, Brandsch M (2005) Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol* 70:1851-1860
- Nachmansohn D, Machado AL (1943) The formation of acetylcholine. A new enzyme choline acetylase. *J Neurophysiol* 6:397-403
- Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA, Zeidel ML (1996) Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol* 271:F886-894
- Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J (2003) Alternate stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 63:332-341
- Neuhuber W (2004) *Autonomes Nervensystem*. Drenckhahn D (Hrsg) Benninghoff A. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 16. Auflage. Band 2: Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Rezeptoren, Haut, Hautanhangsgebilde. Urban & Fischer München Jena, 595-614
- Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Grando SA (2003) Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. *Life Sci* 72:2081-2085
- Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Vetter DE, Wess J, Beaudet AL, Kitajima Y, Grando SA (2004) Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Exp Cell Res* 294:534-549
- Nguyen VT, Ndoeye A, Grando SA (2000) Novel human $\alpha 9$ acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 157:1377-1391
- Nguyen VT, Ndoeye A, Hall LL, Zia S, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kist DA, Zelikson BD, Lawry MA, Grando SA (2001) Programmed cell death of keratinocytes culminates in

apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J Cell Sci* 114:1189-1204

Ogawa H, Fujii T, Watanabe Y, Kawashima K (2003) Expression of multiple mRNA species for choline acetyltransferase in human T-lymphocytes. *Life Sci* 72:2127-2130

Okuda M, Saito H, Urakami Y, Takano M, Inui K (1996) cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun* 224:500-507

Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 3:120-125

Oliver D, Ludwig J, Reisinger E, Zoellner W, Ruppertsberg JP, Fakler B (2001) Memantine inhibits efferent cholinergic transmission in the cochlea by blocking nicotinic acetylcholine receptors of outer hair cells. *Mol Pharmacol* 60:183-189

Orr-Urtreger A, Goldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, Dani JA, Patrick JW, Beaudet AL (1997) Mice deficient in the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack α -bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci* 17:9165-9171

Orr-Urtreger A, Kedmi M, Rosner S, Karmeli F, Rachmilewitz D (2005) Increased severity of experimental colitis in $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor subunit-deficient mice. *Neuroreport* 16:1123-1127

Palma E, Maggi L, Barabino B, Eusebi F, Ballivet M (1999) Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the $\alpha 7$ and $\beta 3$ subunits. *J Biol Chem* 274:18335-18340

Papke RL (1993) The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity. *Prog Neurobiol* 41:509-531

Parnavelas JG, Kelly W, Burnstock G (1985) Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature* 316: 724-725

Parsons SM (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J* 14:2423-2434

Peng CT, Chou IC, Li CI, Hsu YA, Tsai CH, Tsai FJ (2004) Association of the nicotinic receptor $\beta 2$ subunit and febrile seizures. *Pediatr Neurol* 30:186-189

Perry DC, Xiao Y, Nguyen HN, Musachio JL, Davila-Garcia MI, Kellar KJ (2002) Measuring nicotinic receptors with characteristics of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$

- subtypes in rat tissues by autoradiography. *J Neurochem* 82:468-481
- Pfeil U, Haberberger RV, Lips KS, Eberling L, Grau V, Kummer W (2003) Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci* 72:2087-2090
- Pfeil U, Vollerthun R, Kummer W, Lips KS (2004) Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta. *Histochem Cell Biol* 122:121-130
- Phillips HA, Scheffer IE, Berkovic SF, Hollway GE, Sutherland GR, Mulley JC (1995) Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2. *Nat Genet* 10:117-118
- Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005) Stoichiometry of the $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* 25:10905-10912
- Poladia DP, Bauer JA (2005) Functional, structural, and neuronal alterations in urinary bladder during diabetes: investigations of a mouse model. *Pharmacology* 74:84-94
- Popp C, Gorboulev V, Müller TD, Shatskaya N, Koepsell H (2005) Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease. *Mol Pharmacol* 67:1600-1611
- Poth K, Nutter TJ, Cuevas J, Parker MJ, Adams DJ, Luetje CW (1997) Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. *J Neurosci* 17:586-596
- Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG (2002) Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int* 41:291-299
- Prior C, Marshall IG, Parsons SM (1992) The pharmacology of vesamicol: an inhibitor of the vesicular acetylcholine transporter. *Gen Pharmacol* 23:1017-1022
- Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, Spindel ER (2004) Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145: 2498-2506
- Quik M, Chan J, Patrick J (1994) α -Bungarotoxin blocks the nicotinic receptor mediated increase in cell number in a neuroendocrine cell line. *Brain Res* 655:161-167
- Quik M, McIntosh JM (2006) Striatal $\alpha 6^*$ nicotinic acetylcholine receptors: potential targets for Parkinson's disease therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 316:481-489
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L (1996) Functional contributions

of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380:347-351

Ribeiro FM, Alves-Silva J, Volkandt W, Martins-Silva C, Mahmud H, Wilhelm A, Gomez MV, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA (2003) The hemicholinium-3 sensitive high-affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *J Neurochem* 87:136-146

Roghani A, Shirzadi A, Butcher LL, Edwards RH (1998) Distribution of the vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system. *Neurosci* 82:1195-1212

Role LW, Berg DK (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16:1077-1085

Romano SJ, Corriveau RA, Schwarz RI, Berg DK (1997a) Expression of the nicotinic receptor alpha 7 gene in tendon and periosteum during early development. *J Neurochem* 68:640-648

Romano SJ, Pugh PC, McIntosh JM, Berg DK (1997b) Neuronal-type acetylcholine receptors and regulation of alpha 7 gene expression in vertebrate skeletal muscle. *J Neurobiol* 32:69-80

Romih R, Jezernik K, Masera A (1998) Uroplakins and cytokeratins in the regenerating rat urothelium after sodium saccharin treatment. *Histochem Cell Biol* 109:263-269

Romih R, Korosec P, de Mello W jr, Jezernik K (2005) Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res* 320:259-268

Ross SA, Wong JY, Clifford JJ, Kinsella A, Massalas JS, Horne MK, Scheffer IE, Kola I, Waddington JL, Berkovic SF, Drago J (2000) Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *J Neurosci* 20:6431-6441

Rowell PP, Sastry BV (1981) Human placental cholinergic system: depression of the uptake of alpha-aminoisobutyric acid in isolated human placental villi by choline acetyltransferase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 216:232-238

Rubboli F, Court JA, Sala C, Morris C, Chini B, Perry E, Clementi F (1994) Distribution of nicotinic receptors in the human hippocampus and thalamus. *Eur J Neurosci* 6:1596-1604

Rust G, Burgunder JM, Lauterburg TE, Cachelin AB (1994) Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in the rat autonomic nervous system. *Eur J Neurosci* 6:478-485

- Saffen D, Mieda M, Okamura M, Haga T (1999) Control elements of muscarinic receptor gene expression. *Life Sci* 64:479-86
- Sala C, Kimura I, Santoro G, Kimura M, Fumagalli G (1996) Expression of two neuronal nicotinic receptor subunits in innervated and denervated adult rat muscle. *Neurosci Lett* 215:71-74
- Salas R, Orr-Urtreger A, Broide RS, Beaudet A, Paylor R, De Biasi M (2003) The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo. *Mol Pharmacol* 63:1059-1066
- Salpeter MM, Eldefrawi ME (1973) Sizes of end plate compartments, densities of acetylcholine receptor and other quantitative aspects of neuromuscular transmission. *J Histochem Cytochem* 21:769-778
- Sargent PB (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16:403-443
- Sastry BV, Sadavongvivad C (1978) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30:65-132
- Sata R, Ohtani H, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Nakamura T, Uchiumi T, Kuwano M, Nagata H, Tsukimori K, Nakano H, Sawada Y (2005) Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 315:888-895
- Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F, Kawashima K (1999) Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett* 266:17-20
- Schäfer MK, Eiden LE, Weihe E (1998) Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience* 84:361-376
- Schäfer MKH, Weihe E, Erickson JD, Eiden LE (1995) Human and monkey cholinergic neurons visualized in paraffin-embedded tissues by immunoreactivity for VACHT, the vesicular acetylcholine transporter. *J Mol Neurosci* 6:225-235
- Schlatter E, Mönnich V, Cetinkaya I, Mehrens T, Ciarimboli G, Hirsch JR, Popp C, Koepsell H (2002) The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. *J Membr Biol* 189:237-244
- Schmitt BM, Koepsell H (2005) Alkali cation binding and permeation in the rat organic

cation transporter rOCT2. *J Biol Chem* 280:24481-24490

Schneider E, Machavoine F, Pleau JM, Bertron AF, Thurmond RL, Ohtsu H, Watanabe T, Schinkel AH, Dy M (2005) Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intracellular histamine levels. *J Exp Med* 202:387-393

Schweifer N, Barlow DP (1996) The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters. *Mamm Genome* 7:735-740

Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604

Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, Lindstrom J, Spindel ER (1999) Prenatal nicotine increases pulmonary alpha7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J Clin Invest* 103:637-647

Sekhon HS, Keller JA, Benowitz NL, Spindel ER (2001) Prenatal nicotine exposure alters pulmonary function in newborn rhesus monkeys. *Am J Respir Crit Care Med* 164:989-994

Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, Besnard F (2002) A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol* 61:150-159

Sharma G & Vijayaraghavan S (2002) Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol* 53:524-534

Slitt AL, Cherrington NJ, Hartley DP, Leazer TM, Klaasen CD (2002) Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab Dispos* 30:212-219

Solda G, Boi S, Duga S, Fornasari D, Benfante R, Malcovati M, Tenchini ML (2005) In vivo RNA-RNA duplexes from human alpha3 and alpha5 nicotinic receptor subunit mRNAs. *Gene* 345:155-64

Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER (2003) Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 63:214-221

Song P, Spindel ER (2008) Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of non-neuronal acetylcholine in lung cancer provides a new target for cancer therapy. *J Pharmacol Sci* 106:180-185

- Steinlein OK, Magnusson A, Stoodt J, Bertrand S, Weiland S, Berkovic SF, Nakken KO, Propping P, Bertrand D (1997) An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet* 6:943-947
- Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 11:201-203
- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, de Miguel F (2004) Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* 172:1175-1178
- Sylvie B, Helene V, Riccardo C, Maurice I, Jacques M, Marie-Francoise D (1995) Co-regulation of two embedded gene products, choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem* 65:939-942
- Tayebati SK, Vitaioli L, Zaccheo D, Amenta F (1998) Autoradiographic localisation of muscarinic cholinergic receptor subtypes in human placenta. *Neurosci Lett* 247:167-170
- Thiriou DS, Sievert MK, Ruoho AE (2002) Identification of human vesicle monoamine transporter (VMAT2) luminal cysteines that form an intramolecular disulfide bond. *Biochemistry* 41:6346-6353
- Tooyama I, Kimura H (2000) A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. *J Chem Neuroanat* 17:217-226
- Tournier JM, Maouche K, Coraux C, Zahm JM, Cloez-Tayarani I, Nawrocki-Raby B, Bonnomet A, Burlet H, Lebargy F, Polette M, Birembaut P (2006) alpha3alpha5beta2-Nicotinic acetylcholine receptor contributes to the wound repair of the respiratory epithelium by modulating intracellular calcium in migrating cells. *Am J Pathol* 168:55-68
- Trendelenburg U (1988) The extraneural uptake and metabolism of catecholamines. Trendelenburg U, Weiner N (eds) *Catecholamines I. Handbook of experimental pharmacology* Vol 90. Springer Berlin Heidelberg New York, 279-319
- Tsuneki H, Salas R, Dani JA (2003) Mouse muscle denervation increases expression of an alpha7 nicotinic receptor with unusual pharmacology. *J Physiol* 547:169-179
- Tsunoyama K, Gojobori T (1998) Evolution of nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Mol Biol Evol* 15:518-527

- Tucek S (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322:53-69
- Vailati S, Hanke W, Bejan A, Barabino B, Longhi R, Balestra B, Moretti M, Clementi F, Gotti C (1999) Functional $\alpha 6$ -containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol Pharmacol* 56:11-19
- Varoqui H, Erickson JD (1998) The cytoplasmatic tail of the vesicular acetylcholine transporter contains a synaptic vesicle targeting signal. *J Biol Chem* 273:9094-9098
- Veranic P, Romih R, Jezernik K (2004) What determines differentiation of urothelial umbrella cells. *Eur J Cell Biol* 83:27-34
- Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R (1999) Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* 55:209-218
- Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Huang C, Liberman C, Elgoyhen AB, Boulter J (2005) Role of the $\alpha 10$ nAChR subunit gene in the development of the olivocochlear system. ARO Presentation New Orleans, LA, Abstract 395
- Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Turcan S, Ballesterio J, Liberman MC, Elgoyhen AB, Boulter J (2007) The $\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *PNAS* 104:20594-20599
- Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffioti-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (1999) Role of $\alpha 9$ nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* 23:93-103
- Vialou V, Amphoux A, Zwart R, Giros B, Gautron S (2004) Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt intake regulation. *J Neurosci* 24:2846-2851
- Wada E, McKinnon D, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW (1990) The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family ($\alpha 5$) in the rat central nervous system. *Brain Res* 526:45-53
- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW (1989) Distribution of $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\beta 2$ neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284:314-335
- Walker BE (1960) Electron microscopic observations on transitional epithelium of the

mouse urinary bladder. *J Ultrastruct Res* 3:345

Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J (1996) Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem* 271:17656-17665

Wang N, Orr-Urtreger A, Chapman J, Rabinowitz R, Korczyn AD (2003) Deficiency of nicotinic acetylcholine receptor beta 4 subunit causes autonomic cardiac and intestinal dysfunction. *Mol Pharmacol* 63:574-580

Wang N, Orr-Urtreger A, Chapman J, Rabinowitz R, Nachman R, Korczyn AD (2002a) Autonomic function in mice lacking alpha5 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J Physiol* 542:347-354

Wang N, Orr-Urtreger A, Korczyn AD (2002b) The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Prog Neurobiol* 68:341-360

Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, Albuquerque EX, Conti-Fine BM (2001) Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 60:1201-1209

Weihe E, Tao-Cheng JH, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE (1996) Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3547-3552

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci* 72:2055-2061.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77:59-79

Wessler I, Kirkpatrick CJ (2001) Role of non-neuronal and neuronal acetylcholine in the airways. Zaagsma J, Meurs H, Roffel AF (eds) *Muscarinic receptors in airways diseases*. Birkhäuser Verlag Basel, 25-62

Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 134:951-956

Wonnacott S (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20:92-98

- Wonnacott S, Sidhpura N, Balfour DJ (2005) Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr Opin Pharmacol* 5:53-59
- Wonnacott S, Wilkie GI, Soliakov L, Whitaker P (1995) Presynaptic nicotinic autoreceptors and heteroreceptors in the CNS. Clarke PB, Quirk M, Adlkofer F, Thureau K (eds) *Effects of Nicotine on Biological Systems II. Advances in Pharmacological Sciences*. Birkhäuser Verlag Basel, 87-94
- Wu X, Huang W, Ganapathy ME, Wang H, Kekuda R, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V (2000) Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F449-458
- Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei Y, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V (1998) Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem* 273:32776-32786
- Wu XR, Manabe M, Yu J, Sun TT (1990) Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II and III. *J Biol Chem* 265:19170-19179
- Wu XR, Medina JJ, Sun TT (1995) Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. *J Biol Chem* 270:29752-29759
- Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role L, De Biasi M, Beaudet AL (1999) Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5746-5751
- Yoshida M, Inadome A, Maeda Y, Satoji Y, Masunaga K, Sugiyama Y, Murakami S (2006) Non-neuronal cholinergic system in human bladder urothelium. *Urology* 67:425-430
- Yoshida M, Miyamae K, Iwashita H, Otani M, Inadome A (2004) Management of detrusor dysfunction in the elderly: changes in acetylcholine and adenosine triphosphate release during aging. *Urology* 63:17-23
- Yu CR, Role LW (1998) Functional contribution of the alpha5 subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurones. *J Physiol* 509:667-681
- Zarghooni S, Wunsch J, Bodenbenner M, Brüggmann D, Grando SA, Schwantes U, Wess J, Kummer W, Lips KS (2007) Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. *Life Sci* 80:2308-13
- Zenker W (1994) *Feinstruktur des Nervengewebes*. Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg) Ben-

ninghoff A. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 15. Auflage. Band 2: Niere, Reproduktionsorgane, endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. Urban & Schwarzenberg München Wien Baltimore, 220-266

Zhang X, Evans KK, Wright SH (2002) Molecular cloning of rabbit organic cation transporter rbOCT2 and functional comparisons with rbOCT1. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F124-133

Zhang X, Shirahatti NV, Mahadevan D, Wright SH (2005) A conserved glutamate residue in transmembrane helix 10 influences substrate specificity of rabbit OCT2 (SLC22A2). *J Biol Chem* 280:34813-34822

Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA (2000) Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 293:973-981

Zia S, Ndoye A, Nguyen VT, Grando SA (1997) Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 97:243-262

Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C (2002) Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci* 22:8785-8789.

Zwart R, Verhaagh S, Buitelaar M, Popp-Snijders C, Barlow DP (2001) Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in Orct/Slc22a3-deficient mice. *Mol Cell Biol* 21:4188-4196

Zwart R, Vijverberg HP (1997) Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol Pharmacol* 52:886-895

8 Publikationsverzeichnis

8.1 Originalarbeiten

Lips KS, **Wunsch J**, Zarghooni S, Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Wessler I, Schwantes U, Koepsell H, Kummer W (2007) Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. Eur Urol 51:1042-53

Zarghooni S¹, **Wunsch J**¹, Bodenbenner M, Brüggmann D, Grando SA, Schwantes U, Wess J, Kummer W, Lips KS (2007) Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. Life Sci 80:2308-13

¹These authors contributed equally to this study

8.2 Auszeichnung

Eugen-Rehfish-Preis des Forum Urodynamicum 2006

W. Kummer, **J. Wunsch**, S. Zarghooni, T. Bschleipfer, W. Weidner, I. Wessler, H. Koepsell, U. Schwantes, KS. Lips (2006) Azetylcholin im Urothel: Synthese und Freisetzungswege

8.3 Kongressbeiträge

J. Wunsch, S. Zarghooni, I. Wessler, U. Schwantes, K.S. Lips, W. Kummer. Molecular anatomy of the acetylcholine synthesis and release machinery of the mouse

urothelium. Second international symposium on non-neuronal acetylcholine, 31. August - 2. September 2006, Mainz

S. Zarghooni, **J. Wunsch**, M. Bodenbenner, D. Brüggmann, S.A. Grandó, U. Schwantes, W. Kummer, K.S. Lips. Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. Second international symposium on non-neuronal acetylcholine, 31. August - 2. September 2006, Mainz

J. Wunsch, S. Zarghooni, M. Bodenbenner, D. Brüggmann, S.A. Grandó, U. Schwantes, W. Kummer, K.S. Lips. Expression und Lokalisation der muskarinischen und nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren im Urothel der Maus. Jahrestagung Forum Urodynamicum, 09. - 10. März 2007, Bochum

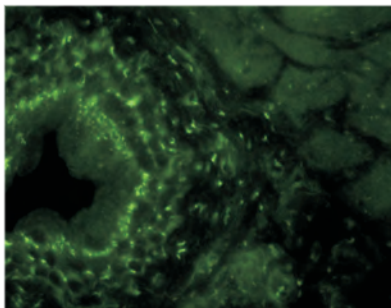
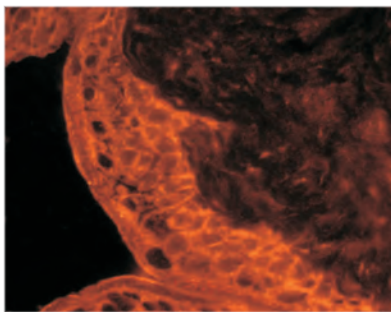
J. Wunsch, J. Geyer, S. Burger, T. Bschleipfer, K. Schukowski, W. Weidner, C. Illig, S. Möller, K.S. Lips. Expression and localization of SLC10A4 in murine and human urothelium. 103rd international meeting of the „Anatomische Gesellschaft“, 14. - 17. März 2008, Innsbruck

9 Danksagung

Für die Überlassung des Themas meiner Arbeit danke ich Frau PD Dr. Katrin Lips und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer. Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Katrin Lips für die sehr intensive Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihr verdanke ich eine ausführliche Einarbeitung in das Labor und die Unterstützung bei der Bewältigung labortechnischer Aufgaben. Außerdem hat sie mich durch eine umfassende Einführung in das Thema der Arbeit und gründliche Hilfestellung bei der schriftlichen Ausarbeitung mit zahlreichen fachlichen Anregungen unterstützt. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für seine Unterstützung während der gesamten Arbeit, die Möglichkeit der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe und die vom Institut gewährten Mittel danken.

Dem gesamten Laborteam der Anatomie I danke ich für die Unterstützung bei der Planung der Versuche und die vielen guten Ratschläge. Besonderer Dank gilt hier Martin Bodenbenner für die stete Hilfestellung und unermüdliche Geduld bei allen aufgetretenen Problemen im Labor. Auch Sabine Tasch, Ulrike Butz-Schiller, Silke Wiegand, Anna Goldenberg und Dr. Rainer Haberberger möchte ich für die Unterstützung bei der technischen Durchführung dieser Arbeit danken. Bei Dr. Uwe Pfeil möchte ich mich für unzählige DNA's, die ich verwenden durfte, bedanken. Karola Michael danke ich für die graphischen Gestaltung der Veröffentlichungen. Mein herzlicher Dank geht an Shirin Zarghooni, mit der ich viele Tage und Nächte gemeinsam im Labor stand und Erfolge wie Misserfolge teilen konnte.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern, Geschwistern und meinem Freund besonders für die liebevolle Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5499-7



9 783595 499971